

Sofia Isabel Rodrigues Ferreira

**Estudos em solução de complexos de vanádio com
3-hidroxi-4-piridinonas com potencial insulino-mimético**

Dissertação de Mestrado Integrado em
Bioengenharia da Universidade do Porto

**Orientadora – Professora Doutora
Maria da Conceição Rangel**

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de
Abel Salazar, Universidade do Porto e UCIBIO-
REQUIMTE, Departamento de Química e
Bioquímica, Faculdade de Ciências,
Universidade do Porto

2015

Agradecimentos

À Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar por me ter aceite como estudante de Mestrado Integrado em Bioengenharia.

Ao REQUIMTE, Grupo de Química Inorgânica e Bioinorgânica, por me ter recebido como aluna de Mestrado permitindo a realização deste trabalho nas suas instalações.

À Professora Doutora Maria da Conceição Rangel, pela excecional orientação, por toda a disponibilidade, apoio, incentivo, atenção e amizade demonstrados.

À Doutora Andreia Leite, o meu especial agradecimento pela sua imensa disponibilidade e pela preciosa ajuda no laboratório. Agradeço toda amizade, paciência, boa disposição e todo o apoio nos momentos menos fáceis.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto por todo acolhimento e simpatia manifestados.

Ao Laboratório de RPE e RMN da Universidade do Porto e à Mariana Andrade pela simpatia e disponibilidade constante.

À Tânia Moniz, o meu especial agradecimento pela sua imensa disponibilidade, dedicação, atenção, incentivo, companheirismo, e agradeço toda amizade, paciência, pelos bons momentos e todo o apoio nos momentos menos fáceis.

Aos meus colegas de laboratório: Ana Margarida, Carla Queirós, André Barbosa, André Silva, José Nuno, Sílvia Lopes por todo o apoio, simpatia, amizade e boa disposição proporcionada durante a execução deste trabalho.

À Sara pela amizade e o carinho demonstrado, pela paciência, pelos bons momentos e companheirismo ao longo destes anos.

À Joana, à Carina e à Cláudia pela amizade e o carinho demonstrado, pela paciência e pelos bons momentos.

João, obrigada por me aturares nos piores momentos, por viveres as minhas alegrias tanto quanto eu, pelo carinho, compreensão, incentivo, amizade e companheirismo.

Às minhas Avós, pelo apoio e suporte demonstrado em todo o meu percurso académico.

À minha Prima, Carolina obrigada por toda a preocupação, carinho, bons momentos, pelas brincadeiras e sobretudo pela amizade.

Aos meus Pais, pelo apoio, amizade, paciência, carinho, compreensão, sacrifícios, preocupação, incentivo, confiança, sem vocês nada seria possível.

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Índice Geral	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Abreviaturas	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Esquemas	xi
Índice de Tabelas	xii
Objetivos e Enquadramento.....	1
Capítulo I: Introdução	4
1. <i>Diabetes Mellitus</i>	4
1.1. <i>Diabetes Mellitus</i> e complexos de catiões de metais como insulino-miméticos	5
2. Complexos de vanádio com 3,4-HPO	7
2.1. Generalidades sobre a química do vanádio	7
2.1.1. O estado de oxidação IV	7
2.1.2. O estado de oxidação V.....	8
2.2. Ligandos do tipo 3-hidroxi-4-pirona e 3,4-HPO	9
2.3. Complexos de vanádio como insulino-miméticos.....	11
3. Sistemas de libertação/transporte controlado.....	16
3.1. Lipossomas como modelos membranares.....	17
3.1.1. Classificação:.....	19
3.1.2. Preparação de lipossomas:	20
3.2. Exemplos da utilização de lipossomas.....	22
4. Técnicas espectroscópicas para o estudo de complexos de vanádio.....	24
4.1. Espectroscopia Ultravioleta/Visível	25
4.2. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrónica.....	25
4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	28
Capítulo II: Metodologia Experimental	31
1. Reagentes, soluções e instrumentação.....	31
2. Preparação de lipossomas.....	33

3. Caraterização do complexo de vanádio VO(dmpp) ₂ nos solventes DMSO, MOPS e H ₂ O por espectroscopia de UV-Vis.....	34
4. Estudo espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e 100K.....	35
5. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de DMPC por espectroscopia de RPE a 100 K.....	37
6. Estudo do complexo VO(dmpp) ₂ em MOPS e em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE e de RMN a temperatura ambiente.....	38
7. Estudo de complexos de vanádio em MOPS por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente.....	40
8. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente.....	41
9. Avaliação do efeito da presença de diferentes quantidades de DMSO em lipossomas de POPC por DLS e por espectroscopia de RMN	42
Capítulo III: Resultados e Discussão	44
1. Caraterização do complexo de vanádio VO(dmpp) ₂ nos solventes DMSO, MOPS e H ₂ O por espectroscopia de UV-Vis.....	44
2. Estudo e caraterização de complexos de vanádio em diferentes solventes por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e 100K.....	45
3. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de DMPC por espectroscopia de RPE a 100 K.....	50
4. Estudo do complexo VO(dmpp) ₂ em MOPS e em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE e de RMN a temperatura ambiente.....	52
5. Estudo de complexos de vanádio em MOPS por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente.....	57
6. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente.....	62
7. Avaliação do efeito de diferentes quantidades de DMSO em lipossomas de POPC por DLS e por espectroscopia de RMN	71
Capítulo IV: Considerações Finais	74
Perspetivas Futuras	76
Capítulo V: Referências Bibliográficas.....	78
Capítulo VI: Anexos	86

Resumo

A *Diabetes Mellitus* é uma doença metabólica que afeta atualmente milhões de pessoas em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde prevê que até 2035 se atinja um número de doentes próximo de 592 milhões. A elevada prevalência e morbidade associadas a esta doença leva à necessidade de desenvolvimento e otimização de novas terapias que possam proporcionar uma melhor qualidade de vida a estes doentes.

A utilização de iões de metal e dos seus complexos constituem uma nova estratégia terapêutica a ser utilizada para o tratamento de uma variedade de doenças, nomeadamente a Diabetes.

Neste trabalho procedeu-se à caraterização de um conjunto de complexos de vanádio com ligandos da família das 3-hidroxi-4-piridinonas, complexos estes com caraterísticas que os tornam promissores quanto ao seu efeito insulino-mimético.

Com base na relevância biológica e na química de coordenação deste metal, e com o recurso a técnicas espectroscópicas, os complexos de vanádio VO(dmpp)₂, VO(depp)₂, VO(hepp)₂ e VO(hexylmpp)₂ foram caraterizados quanto às suas propriedades de oxidação-redução, interação com vários solventes e estudos de localização em modelos membranares de lipossomas.

A espectroscopia de ultravioleta-visível (UV/Vis) foi utilizada como primeira ferramenta para seguir a oxidação dos complexos de vanádio. A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrónica (RPE) foi utilizada para caraterizar a estrutura destes complexos em solução, em vários solventes e em suspensões de lipossoma. Os espectros de RPE permitiram a caraterização das espécies de vanádio (IV) e a determinação dos parâmetros de Hamiltoniano de spin. A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RNM) de ⁵¹V, foi utilizada, em simultâneo com a espectroscopia de RPE, para a caraterização de complexos de vanádio (V), uma vez que estes são diamagnéticos.

Os resultados obtidos permitiram obter informação sobre a solubilidade dos complexos nos diferentes solventes e da gama das concentrações destes complexos na qual é possível utiliza-los nestas técnicas espectroscópicas. Os resultados permitiram ainda caraterizar as diferentes espécies de vanádio (IV) e vanádio (V) em solução a pH 7,4 na presença de oxigénio e de um agente redutor.

Abstract

Diabetes Mellitus is a metabolic dysfunction, which affects millions of people worldwide. The World Health Organization estimated nearly about 592 million patients with diabetes in 2035. The high prevalence and morbidity associated with this disease leads to the need for development and optimization of new therapies that can provide a better quality of life for these patients.

The uses and applications of metal ions and their complexes represent a novel therapeutic strategy being used for the treatment of a variety of diseases, including Diabetes.

In this work we report the characterization of a set of 3-hydroxy-4-pyridinone vanadium complexes, which have shown insulin-like properties.

Based on accumulated knowledge in biologically relevant coordination chemistry of this metal and the use of spectroscopic techniques, we proposed to characterized redox properties, interaction with different solvents and localization studies in membrane models of vanadium complexes VO(dmpp)₂, VO(depp)₂, VO(hepp)₂ and VO(hexylmpp)₂.

Ultraviolet-visible spectroscopy (UV/Vis) was used as a tool to follow the oxidation process of vanadium (IV) complexes. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used to characterize the structure of vanadium (IV) complexes in solution, and as a tool to gain insight into solvent interactions. The EPR spectra allowed the characterization of vanadium (IV) signals and the related spin-Hamiltonian parameters. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, namely ⁵¹V studies, was used, simultaneously with EPR spectroscopy, for the characterization of diamagnetic vanadium (V) complexes.

The results obtained allow us to get information on the solubility of the complexes in study and also about the adequate concentration range for the spectroscopic studies. These results also allow us to characterize the vanadium (IV) and vanadium (V) species in solution at pH 7,4 in aerobic conditions or in the presence of reducing agent.

Abreviaturas

3,4-HPO	3-hidroxi-4-piridinona
<i>A</i>	Constante de acoplamento hiperfino
CH ₂ Cl ₂ -tol	Diclorometano-tolueno
DLS	Dispersão Dinâmica da Luz
DMF	Dimetilformamida
DMPC	1,2 -dimiristoil-glicero-3-fosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO-tol	Dimetilsufóxido-tolueno
<i>I</i>	Spin nuclear
<i>iso</i>	Isotrópico
<i>L</i>	Ligando
LUV'S	Vesículas unilamelares grandes (do inglês: "Large Unilamellar Vesicles")
<i>M</i>	Molar
mM	Milimolar
MLV'S	Vesículas multilamelares (do inglês: "MultiLamellar Vesicles")
MOPS	Tampão ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
<i>S</i>	Spin do elétron
STZ	Estreptozotocina (do inglês: "Streptozocin ")
SUV'S	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês: "Small Unilamellar Vesicles")
<i>T_m</i>	Temperatura de transição de fase

u.a.	Unidades arbitrárias
UV/Vis	Ultravioleta/visível
λ	Comprimento de onda
δ	Desvio químico

Índice de Figuras

Figura 1- Representação esquemática das geometrias possíveis: piramidal quadrada (A), bipiramidal (B) e bipiramidal trigonal (C) para os compostos de vanádio (IV), em que L representa o ligando.....	7
Figura 2 - Representação esquemática de 3-hidroxi-4-Pirona e 3-hidroxi-4-Piridinona	9
Figura 3 - Reação genérica de síntese de piridinonas a partir de pironas.....	10
Figura 4 - Representação esquemática do complexo <i>bis</i> (maltolato) oxidovanádio (IV), BMOV	12
Figura 5 - Representação esquemática do complexo <i>bis</i> (etil maltolato) oxidovanádio (IV), BEOV	13
Figura 6 - Representação esquemática de um lipossoma.....	18
Figura 7- Representação esquemática de um fosfolípido.....	18
Figura 8 - Representação esquemática da influência da temperatura de transição de fase nos fosfolípidos.....	19
Figura 9 - Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas lipossômicas.....	20
Figura 10 - Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico e de SUV's ou LUV's obtidas por sonicação/extrusão	21
Figura 11 - Fórmula do fosfolípido DMPC (1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfatidilcolina)	22
Figura 12 - Fórmula do fosfolípido POPC (1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina).....	22
Figura 13 - Diagrama de distribuição de níveis de energia para dois estados de spin em função do campo aplicado H	26
Figura 14 - Esquema representativo de um átomo sujeito a um campo magnético externo e a interação do spin eletrônico e do spin nuclear.....	27
Figura 15 - Espetro de RPE representativo de (^{51}V) em solução aquosa e registrado à temperatura ambiente.....	28
Figura 16 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{depp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) à temperatura ambiente.....	46
Figura 17 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{depp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) a 100 K.	48

Figura 18 - Espetros de RPE dos complexos de vanádio em lipossomas de DMPC 8mM, a 100 K	51
Figura 19 - Espetros de RPE de VO(dmpp) ₂ em MOPS e em lipossomas POPC, ao longo do tempo (0h, 1h, 2h e 3h)	52
Figura 20 - Espetros de RMN de ⁵¹ V de VO(dmpp) ₂ em MOPS, ao longo do tempo.....	53
Figura 21 - Espetros de RMN de ⁵¹ V de VO(dmpp) ₂ em lipossomas de POPC, ao longo do tempo.....	54
Figura 22 - Espetro de RPE do complexo de VO(dmpp) ₂ em MOPS após a adição de ascorbato de sódio (A). Espetros de RMN de ⁵¹ V do complexo de VO(dmpp) ₂ em MOPS às 0h e às 3h, e às 4h após a adição de ascorbato de sódio (B)	55
Figura 23 - Espetros de RPE de VO(dmpp) ₂ em MOPS com diferentes concentrações (de baixo para cima, respetivamente 1,5mM; 0,15mM e 0,015mM).....	55
Figura 24 - Espetros de RPE dos complexos de vanádio em MOPS (0,06mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h e 24h	57
Figura 25 - Espetros de RPE do complexo VO(depp) ₂ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h	58
Figura 26 - Espetros de RPE do complexo VO(depp) ₂ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) a 100 K	59
Figura 27 - Espetros de RMN de ⁵¹ V de VO(depp) ₂ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h	60
Figura 28 - Espetro de RPE do complexos de VO(dmpp) ₂ em MOPS (0,06mM, e 0,9mM) e POPC à temperatura ambiente, às 0h	62
Figura 29 - Espetro de RPE do complexo de VO(depp) ₂ em MOPS (0,06mM e 0,9mM) e POPC à temperatura ambiente, às 0h	63
Figura 30 - Espetro de RPE do complexo de VO(hepp) ₂ em MOPS (0,06mM e 0,9mM) e POPC à temperatura ambiente, às 0h	64
Figura 31 - Espetro de RPE do complexo de VO(hexylmpp) ₂ em MOPS (0,06mM e 0,9mM) e POPC, às 0h.....	65
Figura 32 - Espetro de RPE dos complexos de vanádio a 100 K com 15% DMSO em lipossomas de POPC e em DMSO puro	67
Figura 33 - Espetros de RMN de ⁵¹ V de VO(dmpp) ₂ (0,06mM) em MOPS e em lipossomas de POPC à temperatura ambiente, às 0h, 24h e 72h	69
Figura 34 - Espetros de RMN de ⁵¹ V de VO(dmpp) ₂ (0,9mM) em lipossomas de POPC às 0h, 24h e 72h a temperatura ambiente.....	70

Figura 35 - Espetros de RMN de ^1H das misturas de lipossoma de POPC com 0%, 5%, 10% e 15% de DMSO, à temperatura ambiente	72
Figura 36 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) à temperatura ambiente.....	86
Figura 37 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) à temperatura ambiente.....	87
Figura 38 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) à temperatura ambiente.....	88
Figura 39 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) a 100 K.....	89
Figura 40 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) a 100 K.....	90
Figura 41 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) a 100 K.....	91
Figura 42 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h.....	92
Figura 43 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h.....	93
Figura 44 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h	94
Figura 45 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) a 100 K.....	95
Figura 46 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) a 100 K.....	96
Figura 47 - Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) a 100 K.....	97
Figura 48 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h	98
Figura 49 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hepp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h	99
Figura 50 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h	100

Figura 51 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{depp})_2$ (0,06mM) em MOPS e em lipossomas de POPC à temperatura ambiente, às 0h, 24h e 72h	101
Figura 52 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hepp})_2$ (0,06mM) em MOPS e em lipossomas de POPC à temperatura ambiente, às 0h, 24h e 72h	102
Figura 53 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ (0,06mM) em MOPS e em lipossomas de POPC à temperatura ambiente, às 0h, 24h e 72h	103
Figura 54 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{depp})_2$ (0,9mM) em lipossomas de POPC às 0h, 24h e 72h a temperatura ambiente.....	104
Figura 55 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hepp})_2$ (0,9mM) em lipossomas de POPC às 0h, 24h e 72h a temperatura ambiente	105
Figura 56 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ (0,9mM) em lipossomas de POPC às 0h, 24h e 72h a temperatura ambiente.....	106

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de Espectroscopia UV/visível	34
Esquema 2 - Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de Espectroscopia de RPE	36
Esquema 3 - Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de Espectroscopia de RMN	39
Esquema 4 - Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de DLS.....	42

Índice de Tabelas

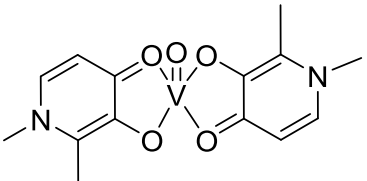
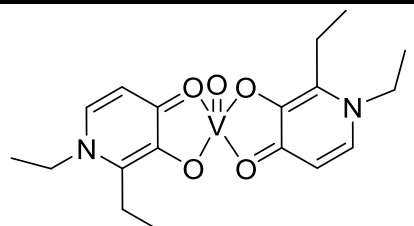
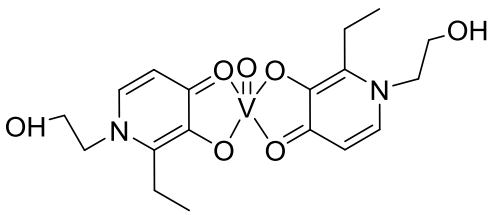
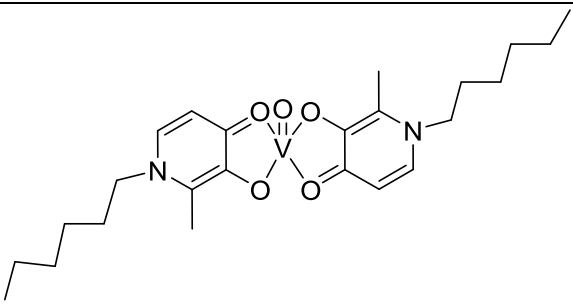
Tabela 1 - Fórmulas de estrutura dos complexos de vanádio estudados neste trabalho	1
Tabela 2 - Representação da espécie de vanádio (IV) existente em solução.....	8
Tabela 3 - Representação das espécies de vanádio (V) existentes em solução.....	9
Tabela 4 - Ligandos do tipo 3,4-HPO utilizados neste trabalho	11
Tabela 5 - Complexos de vanádio utilizados neste trabalho	15
Tabela 6 - Solubilidade dos complexos de vanádio nos diferentes solventes.....	45
Tabela 7 - Parâmetros de Hamiltoniano de Spin (g_{iso} e A_{iso}) para os complexos de vanádio (IV).....	47
Tabela 8 - Parâmetros de Hamiltoniano de Spin para os complexos de vanádio (IV) em DMF, DMSO e CH_2Cl_2 -tol.....	49
Tabela 9 - Representação colorimétrica da solubilidade dos complexos de vanádio em lipossomas de DMPC	50
Tabela 10 - Representação das espécies de vanádio (V) existentes em MOPS e em lipossomas de POPC	54
Tabela 11 - Concentração de complexo e respetiva percentagem (V/V) de DMSO das soluções preparadas para os estudos realizados	56
Tabela 12 - Desvios químicos (ppm) de ^{51}V nos espectros de RMN dos complexos de vanádio em MOPS	61
Tabela 13 - Parâmetros de Hamiltoniano de Spin para os complexos de vanádio (IV) em lipossomas de POPC.....	68
Tabela 14 - Desvios químicos (ppm) de ^{51}V nos espectros de RMN dos complexos de vanádio em lipossomas de POPC.....	70
Tabela 15 - Média de tamanhos (diâmetro (nm)) da população de lipossomas de POPC obtido por DLS	71

Objetivos e Enquadramento

O trabalho de investigação descrito nesta Dissertação insere-se no âmbito da Química Inorgânica Medicinal, nomeadamente no design e aplicação terapêutica de complexos de metal com 3-hidroxi-4-piridinonas (3,4-HPO).

Vários complexos de metais, em particular crómio (III), cobre (II), zinco (II), vanádio (V) e oxidovanádio (IV) provaram ter um efeito semelhante à insulina [1-3]. Em particular os complexos de ligandos do tipo 3,4-HPO têm sido alvo de trabalho de investigação no grupo em que esta Dissertação se insere. Os estudos de caracterização, reatividade e localização destes potenciais fármacos em modelos membranares são também necessários para uma melhor compreensão do mecanismo de ação destes compostos. Neste trabalho são estudados quatro complexos de oxidovanádio (IV), cuja fórmula e abreviatura se encontram representadas na tabela 1.

Tabela 1 - Fórmulas de estrutura dos complexos de vanádio estudados neste trabalho.

 <p style="text-align: center;">VO(dmpp)₂</p>	 <p style="text-align: center;">VO(depp)₂</p>
 <p style="text-align: center;">VO(hepp)₂</p>	 <p style="text-align: center;">VO(hexylmpp)₂</p>

É de notar que a *Diabetes Mellitus* é uma das doenças crónicas mais comuns à escala mundial. O número de pessoas que sofrem desta doença está a aumentar continuamente devido ao crescimento populacional, à urbanização, à obesidade e à falta de atividade física. Em 2010, 285 milhões de adultos (com idade entre 20-79 anos) eram diabéticos e estima-se que, para 2035 este número aumente para 592 milhões de adultos [4, 5]. Mais de 80% das mortes causadas por esta doença ocorrem em países em desenvolvimento.

Atualmente, o tratamento mais utilizado para pacientes com *Diabetes Mellitus* do tipo I é a administração diária de insulina por via intramuscular, enquanto para *Diabetes Mellitus* do tipo II a diminuição dos níveis de glicose é geralmente conseguida através da administração de fármacos por via oral. Como consequência, há uma necessidade urgente de desenvolver agentes terapêuticos que possam ser administrados oralmente, de modo a substituir as injeções de insulina para *Diabetes Mellitus* do tipo I e novos fármacos sintéticos com menores efeitos secundários para *Diabetes Mellitus* do tipo II.

De referir que para este tipo de compostos os tradicionais coeficientes de partição água/octanol não permitem caracterizar o balanço hidro/lipofílico dos mesmos uma vez que os complexos sofrem oxidação na presença de oxigénio e água originando diferentes espécies.

De forma a atingir estes objetivos, perspetivaram-se:

1. O estudo e caracterização das interações dos diferentes complexos de vanádio com diferentes solventes por UV/Vis e RPE;
2. A preparação de diferentes lipossomas para estudos de localização por RPE e RMN;
3. O estudo do processo de oxidação dos diferentes complexos de vanádio por UV/Vis, RPE e RMN;
4. A identificação das espécies de vanádio (IV) e vanádio (V) presentes em solução, a pH controlado de 7,4 por RPE e RMN;

O trabalho foi realizado no grupo da Professora Doutora Maria da Conceição Rangel, UCIBIO-REQUIMTE, Grupo de Química Inorgânica e Bioinorgânica, no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Os espectros de RPE e RMN foram obtidos no LAE (Laboratório de Análise Estrutural) do CEMUP (Centro de Estudos e Materiais da Universidade do Porto).

Capítulo I – Introdução

Capítulo I: Introdução

1. *Diabetes Mellitus*

A ocorrência de distúrbios metabólicos tem vindo a aumentar em todo o mundo, com maior prevalência nos países mais desenvolvidos.

A Diabetes é uma doença metabólica crónica caracterizada por uma incapacidade na manutenção dos níveis ótimos da glicose, com uma tendência para concentrações plasmáticas acima do normal, ou seja, uma situação de hiperglicemia devida a uma deficiência absoluta ou relativa na produção de insulina [6]. A Insulina é a hormona que regula os níveis de glicose no sangue e é segregada pelo pâncreas em resposta a elevados níveis de glicose na corrente sanguínea [7].

A incidência da *Diabetes Mellitus* tem aumentado ao longo dos anos e prevê-se que o número de pacientes seja de 592 milhões em 2035, se estratégias bem-sucedidas não forem implementadas para a prevenção e controle. Prevê-se também entre 2010 e 2030, um aumento de 69% no número de adultos que sofrem de Diabetes ocorrerá nos países em desenvolvimento, enquanto que para a população dos países desenvolvidos se prevê um aumento de 20% [4, 5, 8, 9]. O número de pessoas que sofrem desta doença está aumentar continuamente devido ao crescimento da população, ao aumento da esperança média de vida, à urbanização e à prevalência da obesidade e inatividade física. Infelizmente, muitas pessoas ainda morrem como consequência direta da doença ou de patologias a ela associadas [10].

A *Diabetes Mellitus* é classificada em dois tipos: Diabetes tipo I, ou Diabetes insulino dependente e Diabetes tipo II, ou insulino-independente [6, 11]. O tipo I é uma patologia auto-imune que conduz à destruição das células β pancreáticas e consequentemente incapacidade de produção de insulina pelas células β pancreáticas. Manifesta-se cedo, na infância ou adolescência e o único tratamento é a administração intramuscular diária de insulina. A variante do tipo II manifesta-se em idades mais avançadas e é potenciada por outros distúrbios metabólicos, como a obesidade. As causas podem ser a resistência genética à insulina ou diminuição da produção desta, uma vez que no tipo II as células pancreáticas continuam a produzir a hormona [6, 12, 13]. Outra possível causa poderá estar associada ao recetor da insulina, uma tirosina quinase, que induz a fosforilação de tirosina, iniciando um processo de transdução de sinal para o transportador de glicose ligado à membrana que permite que a glicose seja transportada para dentro da célula [14].

Para a Diabetes do tipo II a redução dos níveis plasmáticos de glicose é geralmente conseguida através da administração de fármacos por via oral em conjugação com exercício físico adequado e dieta. No entanto tem-se verificado que ao longo do tempo, a maioria dos pacientes voltam a ter necessidade de administração de insulina [15]. A administração intramuscular de insulina várias vezes ao dia é um processo doloroso e eleva o nível de stresse do paciente, especialmente em crianças e jovens [7].

A insulina é uma proteína e por isso está sujeita ao ataque por proteases no trato gastrointestinal, comprometendo a possível administração oral da hormona, o que seria uma alternativa mais confortável do que a administração intramuscular [16]. Existem formulações de insulina para inalação de ação rápida, contudo os efeitos secundários mais comuns são o baixo teor de glicose no sangue, tosse, garganta inflamada ou ferida [17]. Como consequência, há uma necessidade urgente de desenvolver agentes terapêuticos oralmente ativos para substituir as injeções de insulina para Diabetes tipo I e novos fármacos sintéticos, com menores ou nenhuns efeitos secundários, tanto para a variante do tipo I como do tipo II.

1.1. *Diabetes Mellitus* e complexos de catiões de metais como insulino-miméticos

A hipótese de utilização de iões de metais para o tratamento da Diabetes surgiu no século XX. Muitos complexos de metais foram sintetizados e avaliados na tentativa de superar os problemas associados à administração intramuscular de insulina e aos efeitos secundários tanto para a Diabetes tipo I como para o tipo II [1, 2, 18]. No entanto, há um interesse especial relativo aos catiões de crómio (III), cobre (II), zinco (II), vanádio (V) e oxidovanádio (IV), uma vez que estes compostos demonstraram possuir propriedades insulino-miméticas ou potenciadores do efeito da insulina [2].

O crómio (Cr) é um metal de transição essencial no metabolismo da glicose e dos lípidos, e também um potenciador do efeito da insulina, tendo sido reconhecido em 1950 por Schwarz e Mertz como um reforço nutricional para o metabolismo da glicose [19]. Em 1977, surge um trabalho original que demonstra a atenuação de sintomas semelhantes ao da Diabetes na presença de um suplemento de crómio, tendo a suplementação com crómio baixado significativamente o nível de glicose em pacientes com Diabetes [20]. As fontes de crómio mais utilizadas no tratamento da doença são o cloreto de crómio, picolinato de crómio e polinicotonato de crómio. O picolinato de crómio possui uma biodisponibilidade mais elevada quando comparado com outras formas complementares de crómio e, por conseguinte, pode ser mais eficaz [20].

O cobre (Cu) é um metal de transição, que integra uma variedade de metaloproteínas, pois permite manter a sua estrutura e função, participando também em processos importantes para o crescimento e proliferação celular [21]. A insuficiência de cobre resulta em várias disfunções do sistema imune, no metabolismo anormal da glicose e colesterol e em danos oxidativos. São conhecidos complexos de cobre com diferentes ações a nível farmacológico, tendo sido recentemente demonstrado que, quando complexado com o ligando ácido picolínico, possui atividade na manutenção e homeostasia da glicose. Mais ainda, o sulfato de cobre demonstrou efeitos benéficos no tratamento da Diabetes [3].

Os complexos de zinco (Zn) têm sido propostos como novos candidatos no tratamento de *Diabetes Mellitus* tipo II [3].

O zinco parece ter uma ação semelhante à insulina, na estimulação da absorção de glicose pelo tecido adiposo, pois a deficiência de zinco resulta na redução da absorção de glicose pelo tecido adiposo. Após administração oral de complexos de zinco (II) com ligandos como o ácido picolínico (*bis*(6-metilpicolinato) $[Zn(6mpa)_2]$, *bis*(maltolato) $[Zn(ma)_2]$, *bis*(1-oxi-2-piridonato) $[Zn(opd)_2]$ -, *bis*(1-oxi-2-piridinetiolato) $[Zn(opt)_2]$ e *bis*(alixinato) $[Zn(alx)_2]$ descobriu-se que estes exibiam atividade anti-diabética em estudos experimentais em ratinhos [3, 22, 23]. Assim a suplementação de zinco pode contribuir para uma melhoria significativa nos níveis de glicose.

Além dos complexos de zinco, os complexos de vanádio têm sido propostos como novos candidatos no tratamento de *Diabetes Mellitus* do tipo II, complexos estes, que são o objetivo de estudo nesta Dissertação, e que serão abordados no ponto 2.3 deste Capítulo.

2. Complexos de vanádio com 3,4-HPO

2.1. Generalidades sobre a química do vanádio

O papel do vanádio nos sistemas biológicos está intimamente relacionado com a sua química de oxidação-redução e química de coordenação deste metal. São conhecidos compostos de vanádio com um amplo leque de estados de oxidação que variam do -3 a +5 [24]. Com especial relevância para esta Dissertação estão os compostos de vanádio com os estados de oxidação +4 e +5 a pH controlado de 7,4. Os estados +4 e +5 são usualmente os mais estáveis, e estão habitualmente associados às espécies VO^{2+} e VO_2^+ respetivamente.

2.1.1. O estado de oxidação IV

O estado de oxidação IV é, comparativamente com o estado de oxidação V, menos estável em solução aquosa e a grande maioria dos compostos de vanádio (IV) contém o ião vanadilo VO^{2+} , também referido como catião oxidovanádio (IV) [24, 25]. O catião vanadilo funciona como um centro metálico, podendo formar complexos aniônicos, catiónicos e neutros com vários tipos de ligandos, sendo uma das posições de coordenação sempre ocupada pelo átomo de oxigénio [25]. Estes complexos apresentam predominantemente geometrias piramidal quadrada, bipiramidal e bipiramidal trigonal (figura 1).

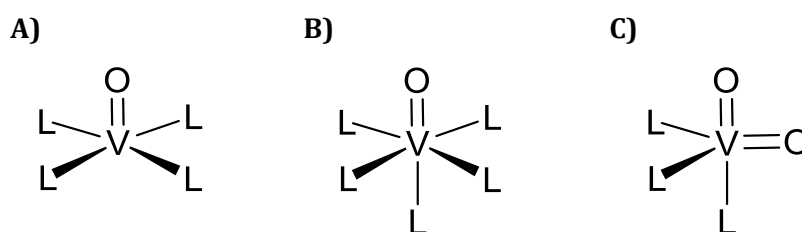
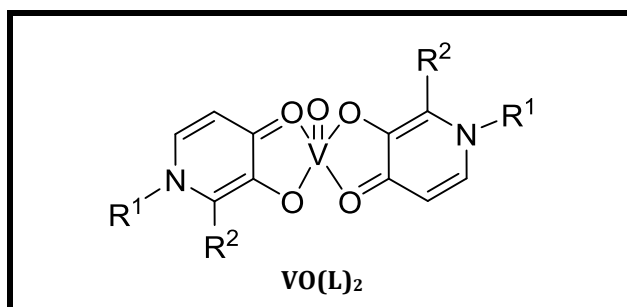


Figura 1 – Representação esquemática das geometrias possíveis: piramidal quadrada (A), bipiramidal (B) e bipiramidal trigonal (C) para os compostos de vanádio (IV), em que L representa o ligando.

O catião oxidovanádio (IV) é uma espécie capaz de participar em reações em meios ácidos, neutros e alcalinos. No entanto, a natureza das espécies de oxidovanádio (IV) presentes em soluções neutras e alcalinas, são ainda motivo de grande controvérsia. Em soluções moderadamente ácidas, o oxidovanádio (IV) existe sob a forma de $[(\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5)]^{2+}$, usualmente representado por VO^{2+} . Na ausência de ligandos para soluções com pH ligeiramente superiores a 4, ocorre a formação de complexos do tipo $[(\text{VO}(\text{OH}))^+]$ e $[(\text{VO}_2(\text{OH})_2)^+]$. A pH superiores a 3,5 o catião VO^{2+} tem tendência a ser oxidado a VO_2^+ pelo oxigénio existente em condições aeróbicas. A pH 4,5 deteta-se o início da formação de um precipitado, $[(\text{VO}(\text{OH})_2)]$, que persiste aproximadamente até pH 6,5. Quando o pH da solução aumenta, até cerca de 11, surge a espécie $[(\text{VO}(\text{OH})_3)]^-$. Admite-se também que entre pH 7 e 11 se formam espécies do tipo $[(\text{VO}(\text{OH})_3)]^{n-}$ [25].

Nesta Dissertação são estudadas espécies de vanádio (IV) em solução e a pH controlado de 7,4 para os complexos de vanádio $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ com os quais se prevê a existência de uma espécie em solução: $\text{VO}(\text{L})_2$ (tabela 2) [26] em que L é o respetivo ligando para cada complexo.

Tabela 2 – Representação da espécie de vanádio (IV) existente em solução (R^1 e R^2 correspondentes à tabela 4).



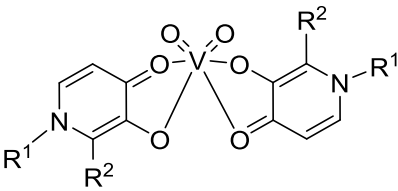
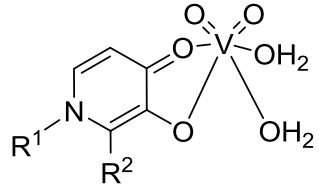
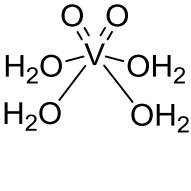
2.1.2. O estado de oxidação V

O estado de oxidação V é o mais estável em meio aeróbico. A maioria dos compostos de vanádio (V) contém o ião vanadato VO_2^+ , também referido como anião vanadato (V) [24]. O vanádio (V) tem uma geometria de coordenação bastante extensa e versátil, apresentando geometrias tetraédrica, bipiramidal trigonal, octaédrica e mistas [27].

Apesar da extensa investigação na identificação e descrição das espécies presentes em solução aquosa, ainda subsistem grandes incertezas relativamente a estas espécies. Em meios fortemente ácidos, existem evidências para a existência da espécie VO^{3+} . Para os valores de pH compreendidos entre 2 e 6,5 (dependendo da concentração da solução) existem em solução várias espécies que podem ser representadas pelas fórmulas $\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{4-}$, $\text{HV}_{10}\text{O}_{28}^{5-}$ e $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$. A pH 7 predomina o ião metavanadato (se a concentração de vanádio for inferior a 10^{-4}M), a principal forma deste ião é VO_3^- (ou a forma hidratada H_2VO_4^-), embora também existam as formas $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ e $\text{V}_3\text{O}_9^{3-}$. Para valores de pH superiores a 8,5 predominam as espécies $\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$ e HVO_4^{2-} . O anião ortovanadato (VO_4^{3-}) existe também em solução para valores de pH superiores a 7 [27].

No que respeita às espécies de vanádio (V) estudadas nesta Dissertação, em solução e a pH controlado de 7,4 para os complexos de vanádio $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ prevê-se a existência de três espécies em solução: $[\text{VO}_2(\text{L})_2]^-$, $\text{VO}_2(\text{L})$ e $[\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ (tabela 3) [28] em que L é o respetivo ligando para cada complexo.

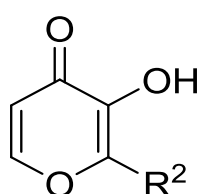
Tabela 3 – Representação das espécies de vanádio (V) existentes em solução (R^1 e R^2 correspondentes à tabela 4).

 <p>$[VO_2(L)_2]^-$</p>	 <p>$VO_2(L)$</p>	 <p>$[VO_2(H_2O)_4]^+$</p>
---	--	--

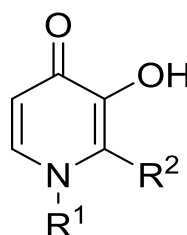
A química de coordenação do vanádio é sem dúvida, de grande relevância quando se pretende estudar o vanádio em sistemas biológicos.

2.2. Ligandos do tipo 3-hidroxi-4-pirona e 3,4-HPO

Ligandos são moléculas que têm a capacidade de se ligar a um íon de metal. Os ligandos são bases de Lewis (doador de elétrons) e o íon de metal a que se ligam, atua como ácido de Lewis (aceitador de elétrons). Ligandos do tipo 3-hidroxi-4-pirona (figura 2) são ligandos bidentados com elevada afinidade para íons de metais $M(II)$ e $M(III)$, resultando na formação de complexos estáveis [29, 30]. Ligandos do tipo 3-hidroxi-4-piridinonas (figura 2) são ligandos bidentados de oxigênio que podem ser extrafuncionalizados para modificar a biodisponibilidade de fármacos ou para auxiliar no direcionamento para tecidos específicos [13].



3-Hidroxi-4-Pirona



3-Hidroxi-4-Piridinona

Figura 2 – Representação esquemática de 3-hidroxi-4-Pirona e 3-hidroxi-4-Piridinona.

A reação de complexação destes quelantes de 3-hidroxi-4-pirona e 3,4-HPO foi estudada em particular com os íons de metal trivalente, como $Fe(III)$, $Al(III)$, $Ga(III)$ e $In(III)$, ou com íons de metal divalentes, como $VO(II)$, $Zn(II)$, $Fe(II)$ e $Cu(II)$ [22, 26, 29, 30].

Com particular interesse neste trabalho estão os ligandos do tipo 3,4-HPO cuja estrutura é composta por um anel *N*-heterocíclico contendo um grupo hidroxilo *orto* em relação ao grupo carbonilo. Estes ligandos podem ser obtidos a partir dos ligandos do tipo

3-hidroxi-4-pirona por reação com aminas primárias (figura 3) obtendo-se assim complexos com maior estabilidade, quando comparados com aqueles formados por ligandos do tipo 3-hidroxi-4-pirona [31-33].

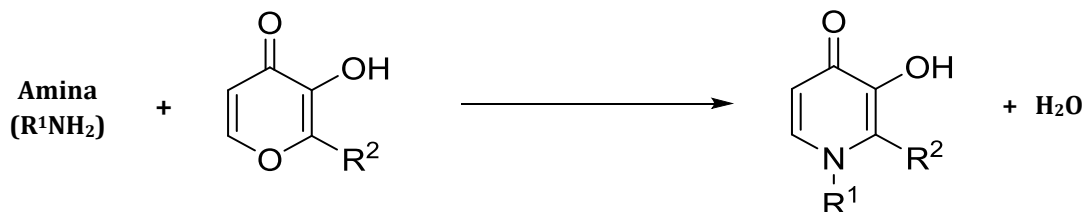


Figura 3 – Reação genérica de síntese de piridinonas a partir de pironas.

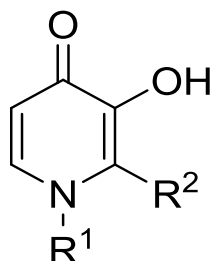
A grande diferença na estabilidade dos complexos para ambos os grupos de ligandos é devida ao fato dos ligandos do tipo 3,4-HPO terem um átomo de azoto heterocíclico na mesma posição em que os ligandos do tipo 3-hidroxi-4-pirona têm um oxigênio heterocíclico e como o átomo de azoto é menos electronegativo conduz a uma constante de estabilidade de formação dos complexos mais elevada do que para os respectivos análogos de 3-hidroxi-4-pirona [6, 26, 34].

A síntese dos ligandos do tipo 3,4-HPO é muito mais versátil do que a síntese dos ligandos do tipo 3-hidroxi-4-pironas, dado que a modificação da cadeia associada ao azoto heterocíclico e os seus substituintes levam a alterações no equilíbrio hidrofílico/lipofílico do ligando, um parâmetro muito importante para o transporte membranar de um fármaco [13, 30].

O balanço hidrofílico/lipofílico é de importância crucial para a utilização de complexos com estes ligandos com vista a aplicações terapêuticas, pois os compostos têm que ser lipofílicos para atravessar membranas biológicas, mas não excessivamente, uma vez que se não houver um equilíbrio entre a hidrofiliabilidade e a lipofiliabilidade, o composto poderá não ser solúvel em água, tendendo a precipitar e acumular-se no plasma, transformando-se num composto tóxico [13].

Com a introdução de diferentes substituintes no anel heterocíclico dos ligandos 3-hidroxi-4-pironas e 3,4-HPO (tabela 4) é possível alterar o balanço hidrofílico/lipofílico destes, tornando-os suficientemente solúveis em água para serem administrados oralmente e com lipofiliabilidade suficiente para atravessar membranas biológicas.

Tabela 4 – Fórmulas e abreviaturas dos ligandos do tipo 3,4-HPO utilizados neste trabalho (nomenclatura de acordo com [31]).



Ligando	R ¹	R ²
Hdmpp	CH ₃	CH ₃
Hdepp	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃
Hhepp	(CH ₂) ₂ OH	CH ₂ CH ₃
Hhexylmpp	(CH ₂) ₅ CH ₃	CH ₃

Mais ainda, a maioria das substâncias entram nas células por difusão simples através da região hidrofóbica da membrana celular e portanto, em geral as substâncias não carregadas penetram mais facilmente do que as que possuem carga. Como os ligandos 3,4-HPO não possuem carga a pH neutro, é de esperar que sejam facilmente absorvidos pelo organismo [13].

Os ligandos 3-hidroxi-4-pirona e 3,4-HPO, são portanto moléculas de grande importância quer sob o ponto de vista de síntese orgânica, como económico, mas particularmente no âmbito da Química Medicinal, tornando-os potenciais candidatos a fármacos a ser usados em inúmeras formulações nas mais diversas áreas [26, 29, 30, 34-36].

2.3. Complexos de vanádio como insulino-miméticos

O vanádio é um elemento metálico que, embora em pequenas quantidades, se encontra largamente espalhado na natureza e cuja importância biológica é atualmente reconhecida. Os seres humanos consomem diariamente 10-60 µg de vanádio através dos alimentos. O corpo humano contém 50-200 µg de vanádio, e em cada órgão, o vanádio está presente em concentrações muito baixas, de 0,01-1 µg, onde participa em vários processos fisiológicos. Nos tecidos, cerca de 90% de vanádio está ligado a proteínas e 10% está presente na forma iónica [3].

O vanádio é um elemento com uma química muito rica que, no contexto da Biologia e da Medicina, forma uma enorme variedade de compostos em que os estados de oxidação mais importantes são III, IV e V [8, 26].

O primeiro relatório da eficácia de um composto vanádio para melhorar o estado diabético dos pacientes data de 1899, um tempo em que se esperava que o vanádio pudesse curar todos os tipos de doenças [37]. No entanto, só no século XX foi iniciada uma investigação dirigida para um composto de vanádio que poderia ser administrado por via oral e produzir efeitos semelhantes à insulina [3, 38-41].

Complexos de vanádio com ligandos orgânicos têm provado ser menos tóxicos do que os sais inorgânicos de vanádio, com melhor solubilidade em água e diferente lipofilicidade. A conceção de novos complexos de vanádio exige considerações a nível de estrutura, das propriedades de oxidação-redução e do número e tipo de ligandos [42].

De acordo com a literatura os complexos de oxidovanádio (IV) com maltol (3-hidroxi-2-metil-4-pirona) e o ácido kójico (3-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona) possuem atividade insulino-mimética e um baixo perfil de toxicidade, tendo sido propostos para uso clínico em humanos [30]. Estes compostos têm mostrado atividade insulino-mimética em estudos *in vivo* com animais tornados diabéticos com estreptozotocina (STZ) nos últimos anos. Desde 1990, que uma ampla classe de complexos de oxidovanádio (IV) que envolvem *bis*(metilcisteinato) $[VO(cysm)_2]$ - (1990), *bis*(L-tartrato) $[(V_2O_4)(L-tart)_2]$ - (1990), *bis*(maltolato) $[VO(ma)_2]$ - (1992), *bis*(pirrolidona-N-ditiocarbamato) $[VO(pdc)_2]$ - (1994), *bis*(picolinato) $[VO(pa)_2]$ - (1995), *bis*(1-oxi-2-piridinetiolato) $[VO(opt)_2]$ - (1999) e *bis*(alixinato) $[VO(alx)_2]$ (1999) mostrou capacidade de redução dos níveis de glicose em ratos com Diabetes induzida experimentalmente [3, 18, 43].

Um dos complexos insulino-mimético de vanádio mais estudado é o *bis*(maltolato) de oxidovanádio (IV), BMOV ou $VO(ma)_2$ descrito pela primeira vez por Orvig e os seus colaboradores (figura 4)[34]. Este apresenta-se como um potencial insulino-mimético capaz de mimetizar o efeito da insulina no corpo humano, sendo eficiente na regulação dos níveis de glicose.

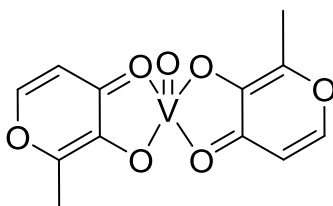


Figura 4 – Representação esquemática do complexo *bis*(maltolato) oxidovanádio (IV), BMOV.

O BMOV foi dos primeiros complexos de vanádio que mostrou uma atividade insulino-mimética superior e baixa toxicidade em relação a sais inorgânicos de vanádio tanto em estudos *in vivo* como *in vitro* [44, 45]. Este complexo também tem sido estudado para evitar algumas consequências patológicas da diabetes, tais como cardiomiopatia e outras disfunções cardíacas [3].

O complexo *bis*(etilmaltolato) oxidovanádio (IV), BEOV ou $VO(ema)_2$ (figura 5) é o análogo do BMOV derivado de etilmaltol, com solubilidade semelhante, maior lipofilicidade e maior estabilidade à hidrólise [46]. Este composto resultou da substituição do maltol pelo etilmaltol, o que demonstra que pequenas alterações estruturais nos ligandos orgânicos podem modificar propriedades importantes dos complexos e torna-los mais adequados para diversas aplicações terapêuticas.

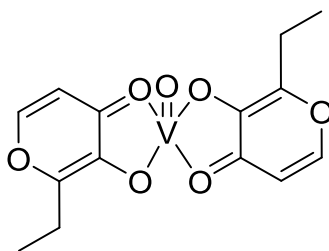


Figura 5 – Representação esquemática do complexo *bis*(etilmaltolato) oxidovanádio (IV), BEOV.

O primeiro teste clínico da fase I em humanos para o complexo BEOV foi realizado por Medeval Ltd. em Manchester, para avaliar a segurança, eficácia e tolerância relativas a este complexo [47]. Os objetivos gerais deste estudo foram avaliar os efeitos na saúde individual, utilizando doses crescentes administradas por via oral, determinação dos parâmetros farmacocinéticos deste complexo no plasma, na urina e nos fluidos biológicos totais, e ainda comparar a biodisponibilidade deste complexo numa dose oral em jejum e após ingestão de alimentos. O resultado deste ensaio clínico mostra a ausência de efeitos adversos na saúde, em qualquer voluntário humano. No que respeita à análise farmacocinética, esta mostrou uma clara dependência da dose na absorção de vanádio a partir do complexo BEOV, com uma absorção mais rápida e eficaz em comparação com os sais inorgânicos de vanádio. Quanto à biodisponibilidade, esta mostrou ser três vezes maior quando comparada a sais inorgânicos de vanádio. Este complexo demonstrou ainda baixa toxicidade a nível hepático e renal, corroborando os resultados anteriores em animais tornados diabéticos com STZ [2, 3]. Este complexo chegou mesmo a completar a fase III dos ensaios clínicos em humanos [47].

A grande vantagem dos complexos de vanádio face à insulina é o fato de estes poderem vir a ser administrados oralmente. A grande desvantagem é a toxicidade associada à quantidade que é necessária administrar para se obter o efeito desejado. Assim surge a necessidade de preparar complexos que possam ser ingeridos e absorvidos levando aos mesmos resultados, com pequenas quantidades.

Foram sintetizados por outros grupos complexos de oxidovanádio (IV): $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$, $\text{VO}(\text{N}_3\text{O}_2)$, $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_3)$, $\text{VO}(\text{S}_2\text{O}_2)$, $\text{VO}(\text{SO}_4)$ e $\text{VO}(\text{O}_4)$, os quais provaram mimetizar o efeito da insulina sendo eficientes a baixas concentrações [6, 34].

Com o complexo BMOV mostrou-se a eficiência na regulação dos níveis plasmáticos de glicose utilizando doses menores, quando comparadas com os sais inorgânicos de vanádio. Este complexo exhibe ainda atividade na diminuição das concentrações de colesterol e triglicéridos no plasma, melhorando e prevenindo assim disfunções cardíacas que são normalmente associadas a doentes portadores da Diabetes. A grande vantagem do composto reside na sua baixa toxicidade a nível hepático e renal [33, 34].

O complexo *bis* (metilpicolinato) oxidovanádio (IV), com uma esfera de coordenação do tipo $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$, foi submetido a testes em ratos tornados diabéticos com STZ, depois de testado *in vitro* quanto ao seu efeito na inibição da libertação de ácidos gordos livres (FFA) pelo tecido adiposo, também este um bom indicativo para a avaliação

do grau da Diabetes, uma vez que o processo é também estimulado pela presença de insulina [6, 34].

Um conjunto de compostos de vanádio (IV) e vanádio (V) com diferentes esferas de coordenação foram testados em fibroblastos de ratos no que diz respeito à sua toxicidade celular a curto prazo e à sua capacidade para estimular a captação de glicose pelas células. Os compostos investigados foram $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$, $[\text{VO}(\text{acetilacetato})_2]$, $[\text{VO}_2(\text{dipicolinato})]$ e $[\text{VO}(\text{maltolato})_2]$. Com este estudo verificou-se que estes compostos são tóxicos com concentrações de 1mM, contudo estes não são tóxicos com concentrações iguais ou inferiores a 0,01 mM. Mais ainda compostos de vanádio (V) tendem a ser menos tóxicos do que compostos de vanádio (IV) [48].

Nos últimos anos, as piridinonas têm sido testadas e propostas como compostos quelantes com enorme eficácia na remoção de ferro e alumínio e na administração de isótopos de gálio e índio em radiodiagnóstico e radioterapia, demonstrando assim a sua importância farmacêutica [6]. Assim surgiu a ideia de sintetizar novos compostos de vanádio com diferentes piridinonas de modo a obter compostos com diferentes balanços hidrofílicos/lipofílicos.

O composto 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridinona (Hdmpp), comercialmente conhecido como *Deferiprone*, é utilizado atualmente no tratamento da β -talassemia, uma doença genética associada à acumulação de ferro no organismo [32], razão pela qual o composto $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ ter sido particularmente estudado pelo grupo. Foram realizados estudos em solução aquosa sob condições aeróbicas e anaeróbicas, e avaliadas as propriedades de oxidação-redução deste complexo, pois o estudo do comportamento deste complexo em solução aquosa é importante para obter informação sobre os parâmetros que podem afetar o seu desempenho *in vivo*. Mais ainda, foi feita a caracterização das espécies presentes em solução a pH variável [28, 32].

À semelhança, deste estudos, foram feitos outros, com diferentes ligandos do tipo piridinona com oxidovanádio (IV) em solução aquosa [8, 26].

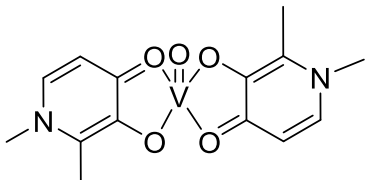
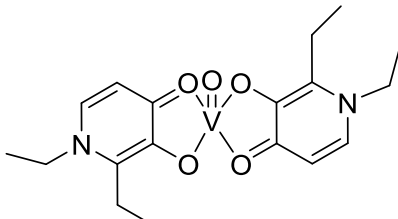
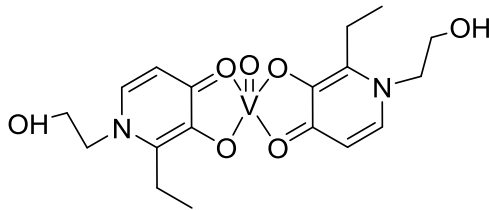
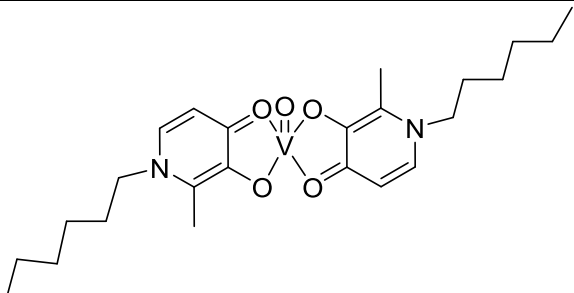
Apesar de todos os estudos que estão a todo o momento a decorrer nesta área, são necessários estudos de caracterização de complexos de vanádio já existentes de modo a aferir qual a melhor estratégia para a utilização eficaz no tratamento da doença.

Além dos complexos de vanádio com pironas, picolinatos e dipicolinatos que exibem propriedades insulino-miméticas, surgiu uma família de ligandos, com destaque no nosso grupo de Investigação, que começou a ser estudada sob o ponto de vista químico e farmacológico: as hidroxipiridinonas, nomeadamente as 3,4-HPO.

Deste modo, vários trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos pelo grupo com o objetivo de sintetizar complexos de vanádio com 3,4-HPO com propriedades insulino-miméticas, que permitam a sua utilização em doses reduzidas.

Neste sentido, apresentam-se nesta Dissertação quatro complexos de vanádio, já sintetizados no nosso Laboratório, designados por $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ com ligandos 3,4-HPO (tabela 5), para estudos de caracterização, oxidação e localização em modelos membranares através de diferentes técnicas espectroscópicas.

Tabela 5 – Complexos de vanádio utilizados neste trabalho (nomenclatura de acordo com [31]).

 <p>VO(dmpp)₂</p>	 <p>VO(depp)₂</p>
 <p>VO(hepp)₂</p>	 <p>VO(hexylmpp)₂</p>

3. Sistemas de liberação/transporte controlado

Os sistemas de transporte de fármacos, ou sistemas de liberação controlada de fármacos são definidos como “o uso de qualquer meio possível, seja ele químico, físico-químico ou mecânico para regular a velocidade de acesso de um fármaco ao local de ação isto é, diretamente nos tecidos envolvidos” [49].

O estudo sobre sistemas de liberação controlada de fármacos está em constante crescimento, pois visa diminuir os efeitos adversos causados, melhorando a eficácia terapêutica, através da ação direta dos fármacos no seu local de ação [50, 51]. Estes sistemas apresentam várias vantagens em relação aos sistemas convencionais, sendo possível obter um aumento da biodisponibilidade e uma melhor aceitação do tratamento pelo paciente [52, 53].

Custo elevados de desenvolvimento de novas moléculas ativas torna os sistemas de liberação de fármacos uma das áreas mais promissoras da indústria farmacêutica. Isto porque novas formulações de nanopartículas podem resgatar fármacos promissores, que foram descartados após grandes investimentos devido à descoberta de potenciais efeitos adversos ou baixa biodisponibilidade [50]. Deste modo, fármacos já existentes são apresentados com novas formulações, utilizando novas formas de transporte. Estes sistemas tornaram-se assim, ferramentas importantes para a liberação específica de uma vasta gama de fármacos e têm vindo a evoluir de modo a produzir sistemas avançados, de elevada sofisticação e espectro alargado [51, 54].

A criação destes sistemas de transporte surge da necessidade da redução dos efeitos tóxicos dos fármacos devido ao facto da concentração para uso terapêutico ser, muitas vezes, próxima da concentração tóxica e o tempo de vida de alguns fármacos ser reduzido [54-57]. Com o controle da localização do fármaco no corpo, os efeitos secundários podem ser reduzidos, levando à administração de doses menores, utilizando menor quantidade do princípio ativo [51, 52]. Idealmente, um fármaco de efeito sistémico deve permanecer na circulação o tempo necessário para o efeito terapêutico desejado ser alcançado [54].

Atualmente, existem vários sistemas de liberação controlada, desde nanopartículas, nanotubos, micelas poliméricas, polímeros e lipossomas. De todos estes sistemas os que se encontram melhor caracterizados e os primeiros a serem desenvolvidos foram os lipossomas [51, 58, 59]. Devido à sua composição, tamanho e propriedades físico-químicas, os lipossomas permitem numerosas aplicações em diversas áreas científicas como a Química, Biologia, Bioquímica, Medicina ou na Indústria [51, 52, 55, 58].

A caracterização, tanto estrutural como a nível de oxidação, assim como as propriedades de partição dos complexos de vanádio com diferentes lipofilicidades/hidrofilicidades é de extrema importância, pois permite obter informação preciosa no que respeita à difusão e transporte destes complexos em membranas biológicas [13]. É habitual a determinação de coeficientes de partição recorrendo ao sistema octanol/água, contudo este método só é aplicável a substâncias puras que não se dissociam e não exibam atividade interfacial significativa [60]. Como consequência, para

complexos de vanádio os coeficiente de partição em octanol/água não têm qualquer significado, dado que as espécies presentes são muito variáveis e possuem diferentes estados de oxidação.

Assim para caraterizar estes complexos, à semelhança do que se verificou para os complexos de Cobre em estudos realizados pelo grupo de Investigação onde se insere esta Dissertação [31], optou-se por usar lipossomas.

3.1. Lipossomas como modelos membranares

Os lipossomas exibem muitas das propriedades das membranas celulares, o que os torna um modelo membranar mimético valioso no estudo das propriedades das membranas biológicas, que são compostas por uma bicamada fosfolipídica contínua [61].

Os lipossomas, por sua vez, são constituídos basicamente por lípidos, o que leva a serem bastante utilizados no estudo das propriedades membranares, constituindo um modelo membranar que tenta imitar a estrutura e propriedades das membranas biológicas [61]. A principal vantagem de lipossomas é a capacidade de modular as condições experimentais de modo a mostrar a influência de determinados fatores, como a composição lipídica, a temperatura, a força iónica ou o pH do meio em que se encontram [61, 62]. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não induzirem resposta imune são muito versáteis, tornando-se úteis em várias aplicações terapêuticas e aplicações analíticas [62, 63]. O pré-requisito para o uso de lipossomas como sistemas miméticos de membranas ou como sistemas de transporte de fármacos é a utilização de métodos que permitam a caraterização e controle de fatores como: a preparação, tamanho das vesículas, composição, estabilidade e taxa de encapsulação de fármacos, pois estes fatores influenciam diretamente o comportamento dos lipossomas em meio biológico [61]. O aumento da eficiência de encapsulação e de libertação do fármaco *in vivo* constitui o principal alvo das pesquisas que envolvem lipossomas. A estrutura dos lipossomas está de acordo com as principais funções das membranas biológicas, estes constituem uma barreira de permeabilidade e são um suporte onde se encontram inseridas proteínas com diferentes funções [64]. Os lipossomas são definidos como estruturas esféricas, vesículas, compostas por uma bicamada fosfolipídica concêntrica, que encerra no seu interior um determinado volume de solução aquosa (figura 6) [51, 62]. Estes podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana [51, 61, 62].

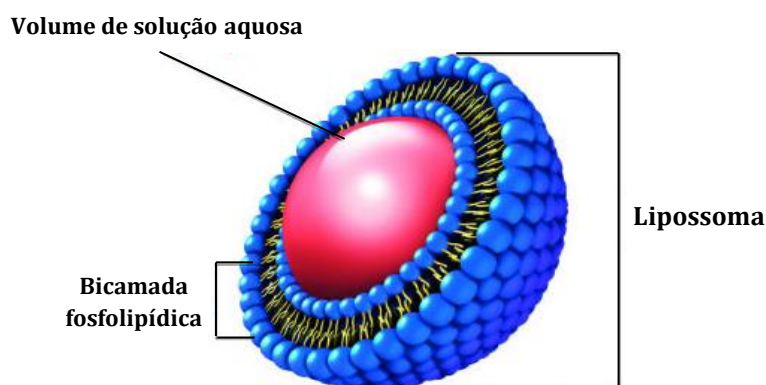


Figura 6 - Representação esquemática de um lipossoma.

Outra grande vantagem destas vesículas é serem constituídas basicamente por fosfolípidos, que são os principais constituintes das membranas celulares [61].

Os fosfolípidos são de natureza anfifílica, ou seja, possuem simultaneamente, um grupo hidrofílico (solúvel em água) e um grupo hidrofóbico (insolúvel em água). Tipicamente, um lipossoma é constituído por fosfolípidos com duas cadeias hidrocarbonadas (designado por cauda hidrofóbica) ligadas a um grupo hidrofílico (designado por cabeça hidrofílica/polar) (figura 7) [49, 65]. Quando expostos a um ambiente aquoso as interações hidrofílicas entre os grupos polares, as interações de Van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas e as ligações de hidrogénio com moléculas de água levam à reorganização espontânea em bicamadas onde os grupos polares se encontram à superfície, numa fase aquosa e as cadeias hidrocarbonadas no interior da bicamada [49, 65].

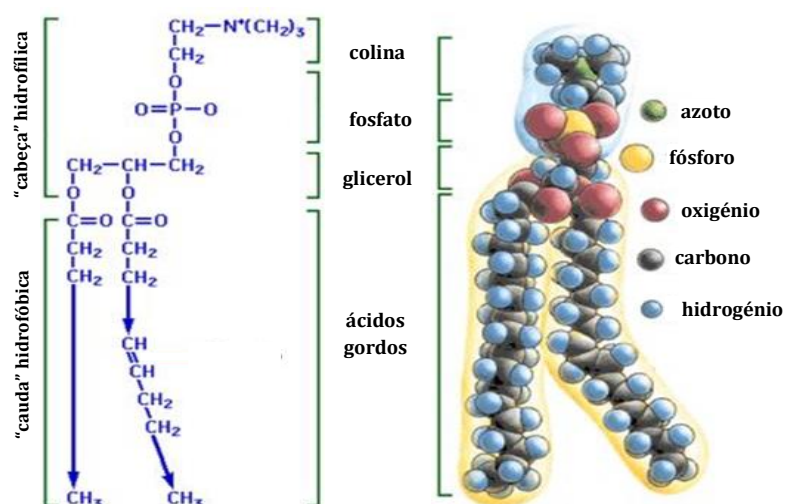


Figura 7 - Representação esquemática de um fosfolípido.

Os fosfolípidos podem ser de origem natural, ou sintética, de modo a serem idênticos à membrana celular que se pretende estudar. Os lípidos de origem sintética apresentam uma composição lipídica definida, contudo as cadeias hidrocarbonadas podem ter maior ou menor número de átomos de carbono, ácidos gordos diferentes ou iguais e cadeias saturadas ou insaturadas [49, 64]. O facto de possuírem uma maior homogeneidade permite uma melhor compreensão, caracterização e manipulação do seu comportamento relativamente aos fosfolípidos de origem natural, fazendo dos sintéticos a escolha para a preparação de lipossomas [49, 64].

Diferentes propriedades físicas como a permeabilidade, a temperatura de transição de fase (T_m) ou a estabilidade dependem da composição dos ácidos gordos que constituem os fosfolípidos, tanto ao nível do comprimento das cadeias hidrocarbonadas, do seu grau de saturação/insaturação como das propriedades dos grupos polares que os constituem [49, 64]. Com diferentes temperaturas, as bicamadas fosfolipídicas possuem diferentes fases termodinâmicas: uma fase muito ordenada, denominada fase de gel e uma fase mais fluida, denominada fase de “cristal-liquido” (figura 8). Para temperaturas inferiores a T_m dos fosfolípidos, a bicamada apresenta uma estrutura muito ordenada, pelo contrário com temperaturas acima da T_m dos fosfolípidos existe uma maior fluidez da membrana, havendo maior mobilidade [49, 64].

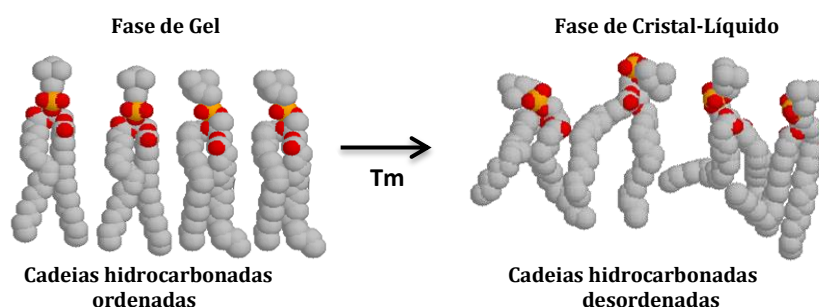


Figura 8 – Representação esquemática da influência da temperatura de transição de fase nos fosfolípidos.

Uma compreensão da temperatura de transição de fase e fluidez das bicamadas fosfolipídicas é de extrema importância para a formulação e aplicações dos lipossomas, pois o comportamento termodinâmico da membrana do lipossoma determina propriedades como a permeabilidade, fusão, agregação e ligação a proteínas, o que pode afetar a estabilidade dos mesmos e o seu comportamento em sistemas biológicos [49].

3.1.1. Classificação:

O tamanho dos lipossomas pode variar entre 20 nm até cerca de 1000 nm. Contudo, as dimensões destas vesículas dependem do método utilizado para as preparar, isto porque lipossomas com diferentes tamanhos, necessitam de diferentes métodos de preparação. As diferentes aplicações e estudos experimentais requerem determinadas

dimensões [51, 61, 66]. A classificação dos lipossomas é feita de acordo com o seu tamanho (figura 9). Assim os lipossomas podem ser classificados como:

- vesículas multilamelares (**MLV's** – MultiLamellar Vesicles), que possuem um tamanho de estrutura relativamente elevado e um volume interno bastante menor devido à subdivisão da estrutura em várias bicamadas concêntricas;
- vesículas unilamelares grandes (**LUV's** – Large Unilamellar Vesicles) com diâmetros superiores a 50 nm;
- vesículas unilamelares pequenas (**SUV's** - Small Unilamellar Vesicles) com dimensões entre 20 e 50 nm [51, 61];

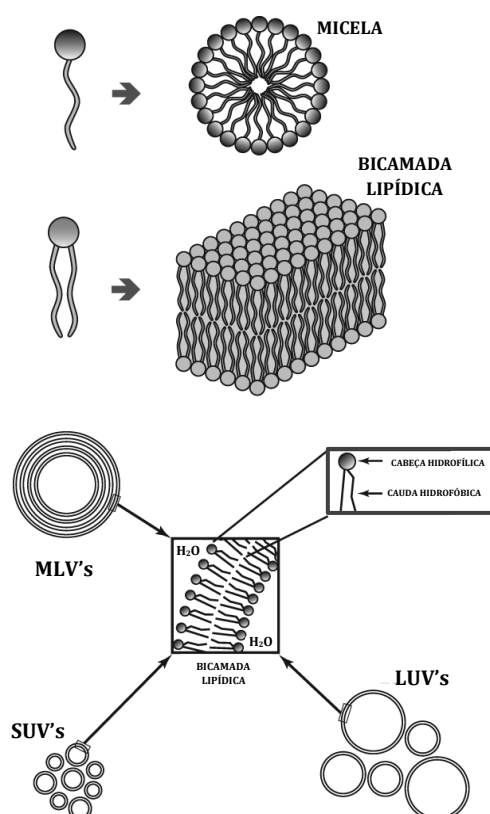


Figura 9 - Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas lipossômicas (adaptado de [67]).

3.1.2. Preparação de lipossomas:

As propriedades dos lípidos podem variar dependendo da composição (catiônicos, aniônicos, neutros), no entanto, o mesmo método geral de preparação pode ser utilizado para todas as vesículas de lipossoma, independentemente da sua composição [61]. Os elementos gerais do procedimento envolvem a preparação de lípido para a hidratação, com agitação, e dimensionamento para uma distribuição homogênea das vesículas. Assim existem vários processos para preparação, estes podem ser preparados por congelamento/descongelamento, sonicação, extrusão, entre outros, e a escolha do método

depende da aplicação final atribuída aos lipossomas [61]. Todos os métodos de preparação de lipossomas abrangem passos comuns, para a obtenção de MLV's, LUV's ou SUV's, como a dispersão do fosfolípido num meio aquoso. As moléculas fosfolipídicas não são solúveis em água, assim um dos passos da preparação de lipossomas necessita da solubilização dos fosfolípidos num solvente apolar adequado após a qual se prepara um filme lipídico por evaporação desse solvente [61, 68].

Para a preparação de lipossomas utilizou-se o método de hidratação do filme lipídico. Através da dispersão do filme lipídico em solução aquosa, produz-se MLV's, de vários tamanhos e várias camadas lipídicas que posteriormente, podem ser tratadas de forma a obter vesículas de tamanho definido, para isto são utilizados meios mecânicos, a extrusão, através de filtros de tamanho de poro fixo, ou a sonicação (figura 10) [49, 61].

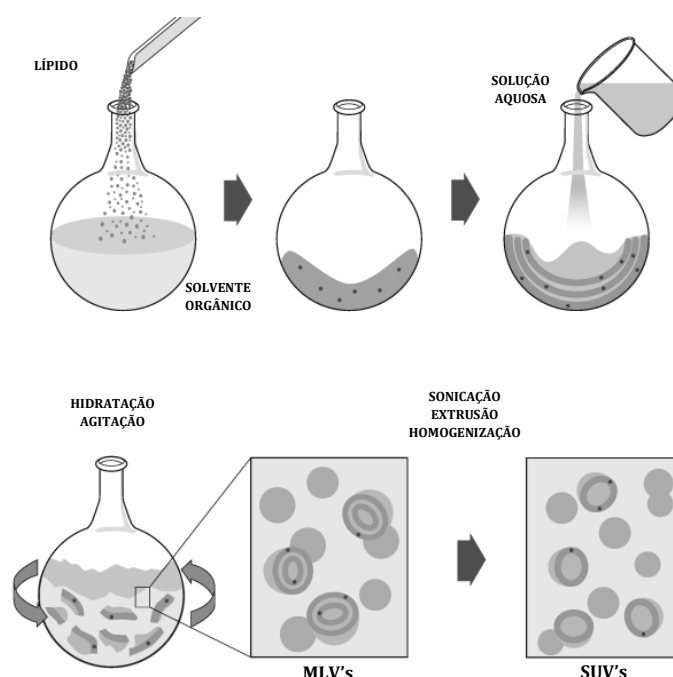


Figura 10 - Representação esquemática da preparação de MLV's pelo método de hidratação do filme lipídico e de SUV's ou LUV's obtidas por sonicação/extrusão (adaptado de [67]).

Para a obtenção de populações de lipossomas homogêneas, podem ser utilizados ciclos de congelamento/descongelamento pois permitem aumentar o volume interno aquoso dos lipossomas através da eliminação das sucessivas camadas lipídicas presentes nas MLV's [61]. A sonicação é muito utilizada na preparação de SUV's podendo ser realizada por inserção da suspensão de lipossoma num banho ou através da inserção de uma ponta de ultra-sons diretamente na suspensão. A extrusão consiste na passagem forçada, através de filtros com um diâmetro de poro bem definido, sob pressão, atmosfera inerte e a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos presentes na suspensão de lipossoma. Extrusões sucessivas levam a uma diminuição do número de lamelas que compõem as MLV's e, passadas cerca de dez passagens, obtém-se uma suspensão de lipossoma unilamelar e homogênea, no que diz respeito ao diâmetro das

vesículas. As LUV's, permitem uma boa encapsulação e uma boa estabilidade dos lipossomas [49, 61, 64, 68].

Para este trabalho foram preparados lipossomas (LUV's) de 1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC).

A constituição da membrana de mamíferos inclui essencialmente fosfolípidos, os que os torna o principal componente lipídico em lipossomas. Um dos modelos mais frequentemente utilizados são lipossomas de DMPC (figura 11), um fosfolípido zwiteriônico, utilizado como sistema modelo para membranas das células de mamíferos [64, 69].

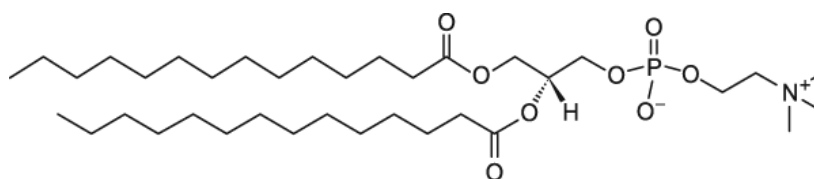


Figura 11 - Fórmula do fosfolípido DMPC (1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfatidilcolina) [67].

À semelhança de lipossomas de DMPC, os lipossomas de POPC são também utilizados como sistema modelo para membranas das células de mamíferos. POPC (figura 12) é tipicamente considerado um dos lípidos modelo para experiências biofísicas [70]. A fosfatidilcolina (PC) é geralmente o lípido mais abundante nas membranas celulares de animais, e faz parte da barreira de permeabilidade existente nas células animais [70].

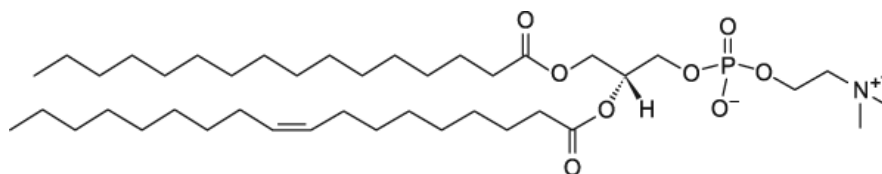


Figura 12 - Fórmula do fosfolípido POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina) [67].

3.2. Exemplos da utilização de lipossomas

Os exemplos de aplicações de lipossomas são imensos. Os lipossomas são bastante úteis, como modelos, em diversas áreas como a Química, Bioquímica e Biologia. Em 1976, Gregoriadis propôs a utilização de lipossomas como vetores farmacológicos no transporte e libertação de fármacos. Presentemente, os lipossomas, assumem uma posição de relevo face às vantagens decorrentes das características únicas destes sistemas que os tornam

veículos seguros e eficazes, como: a biocompatibilidade, resultante, por um lado, da sua biodegradabilidade e toxicidade reduzida, e por outro lado, do facto de não provocarem reações imunogénicas; a grande versatilidade estrutural, devido ao facto dos lipossomas à semelhança das membranas serem constituídos, na sua maior parte, por fosfolípidos, que embora não mimetizem perfeitamente a membrana, é possível aumentar o nível de similaridade entre eles, através da inserção de proteínas nas vesículas de lipossomas [68, 71-74]; a possibilidade de manipulação das suas características físico-químicas e a possibilidade de fusão com células, que facilitam a encapsulação de fármacos. O estudo de lipossomas permite, também, avaliar o comportamento de fármacos nas células. Dependendo da natureza do fármaco, este pode encontrar-se em locais membranares distintos, assim, em termos de localização, um fármaco pode atuar com as vesículas de lipossoma a três níveis distintos: caso o fármaco seja hidrossolúvel vai encontrar-se no compartimento aquoso do lipossoma, caso seja hidrofóbico, vai encontrar-se na zona lipídica da bicamada, mas se for anfotérico, o fármaco rearranja-se de modo a colocar a sua parte hidrofílica junto aos grupos polares da membrana e a sua parte hidrofóbica junto às cadeias hidrocarbonadas [61, 75, 76].

Na medicina a utilização de lipossomas para o desenvolvimento de sistemas de transporte e libertação de fármacos abriu novas possibilidades para o tratamento de forma segura e eficaz de várias doenças, principalmente no cancro, através do aumento do tempo de circulação destes e da entrega do fármaco na célula ou tecido alvo, havendo resultados no tratamento de cancro colo-rectal, doenças do trato gastrointestinal, no cancro da próstata, entre outros [77-80]. Na microbiologia são preparados lipossomas a partir de lípidos bacterianos para o estudo da influência de vários fatores, tais como, interações destes lípidos com péptidos anti-microbianos [81-83]. Na química os lipossomas podem ser utilizados para estudos de localização e partição de vários compostos e descoberta de marcadores específicos [61, 84, 85].

4. Técnicas espectroscópicas para o estudo de complexos de vanádio

Os métodos espectroscópicos são ferramentas poderosas para o estudo de complexos de metais de transição e de sistemas biológicos. Estes métodos são úteis para a análise espectroscópica de componentes individuais num sistema biológico, tais como proteínas, ácidos nucleicos e metabolitos. A espectroscopia pode também fornecer informações detalhadas sobre a estrutura e o mecanismo de ação das moléculas [61].

O vanádio (IV) é um ião de metal paramagnético, enquanto o vanádio (III) e (V) são espécies diamagnéticas. Consequentemente várias técnicas espectroscópicas podem ser utilizadas para a caracterização das espécies de vanádio. Com espectroscopia UV/Vis é possível uma deteção do vanádio a nível da oxidação, contudo não é suficiente para caracterizar a sua geometria de coordenação e a sua estrutura eletrónica. A Ressonância Paramagnética Eletrónica (RPE) revelou ser a ferramenta mais poderosa para a caracterização, tanto estrutural como a nível de oxidação de complexos de vanádio [26, 86, 87]; assim como a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para os complexos de vanádio (III) e vanádio (V) [28, 88]. Mais ainda, estas técnicas espectroscópicas de ressonância, RPE e RMN, têm sido muito utilizadas para estudos de processos dinâmicos, fornecendo informações sobre a dinâmica de lípidos e estrutura da membrana, tendo aplicações em diversas áreas, na química, na física, na biologia e na medicina/farmacologia.

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação é caracterizada pela sua energia, E , que está relacionada com a respetiva frequência, ν , e com o comprimento de onda, λ , da radiação pela relação de Planck:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad eq. 1$$

em que c é a velocidade da luz; $2,998 \times 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; h é a constante de Planck, $6,625 \times 10^{-27} \text{ erg} \cdot \text{s}^{-1}$. Assim, a radiação pode ser interpretada como uma onda sinusoidal eletromagnética, ou seja, como a propagação simultânea de um campo elétrico e de um campo magnético, que se propagam perpendicularmente entre si, periodicamente no tempo e no espaço [61].

O Espetro Eletromagnético é habitualmente dividido em regiões de acordo com o comprimento da onda, abrangendo desde as ondas de rádio, as microondas, a radiação infravermelha, a luz visível, os raios ultravioleta, os raios X até à radiação gama.

Os comprimentos de onda da radiação utilizada em Espectroscopia estendem-se desde os raios-x, $\lambda \approx 1\text{-}100 \text{ nm}$, até às microondas, $\lambda \approx 10^5 - 10^6 \text{ nm}$. Na RPE a radiação utilizada situa-se na região das microondas [61].

De um modo geral, nas diferentes técnicas espectroscópicas aplica-se radiação contínua e em seguida regista-se a intensidade da radiação depois de passar através da

amostra de interesse. A intensidade é então determinada como uma função da frequência de radiação sendo o resultado o espectro de absorção da amostra.

4.1. Espectroscopia Ultravioleta/Visível

A absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta-visível por parte de moléculas, átomos ou iões está normalmente associada a transições eletrónicas. Estas ocorrem, quando por interação da radiação eletromagnética com o meio absorvente, um eletrão é promovido de um estado eletrónico de baixa energia para outro de energia mais elevada [89].

Assim é possível observar na região do UV/Vis, transições relacionadas com os complexos de metais de transição, que permitem, obter informação sobre os estados de oxidação e geometrias de coordenação. Geralmente, os espectros de compostos de metais de transição, em solução, apresentam um conjunto de bandas com baixas absorptividades molares e situadas entre valores de λ de 300 a 900 nm [89].

4.2. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrónica

O eletrão possui um momento magnético diferente de zero que é definido por:

$$\mu_e = -g \beta_e s \quad eq. 2$$

em que β_e é o magnetão de Bohr e s o momento angular de spin.

Na ausência de campos magnéticos ou elétricos externos os eletrões estão dispostos aleatoriamente. No entanto e em virtude de possuírem momento angular de spin, quando sujeitos a um campo magnético externo, tendem a alinhar-se numa direção paralela ao campo quer no mesmo sentido quer em sentido oposto o que corresponde a distribuírem-se por dois estados de energia diferentes (o estado de mais baixa energia corresponde ao alinhamento no sentido do campo)[49, 61].

Este efeito é denominado Efeito Zeeman e a diferença de energias entre os dois estados é dada pela equação:

$$\Delta E = g \beta_e H_0 \quad eq. 3$$

em que H_0 é o campo magnético externo e g a constante de proporcionalidade designada por fator g . Este efeito é ilustrado na figura 14.

Em termos quânticos os níveis permitidos para o spin do eletrão, S , são quantificados e as suas componentes $m_s = +1/2(\alpha)$ e $-1/2(\beta)$. A possibilidade de transição entre estes dois estados representa a mais simples transição RPE (por exemplo, eletrões livres) [61].

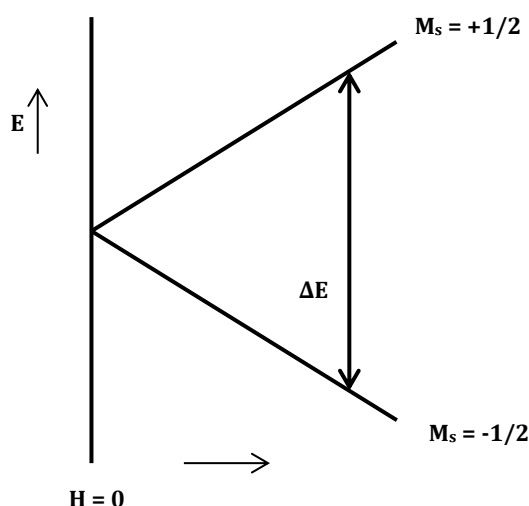


Figura 13 - Diagrama de distribuição de níveis de energia para dois estados de spin em função do campo aplicado H .

Para um dado valor de campo magnético, um eletrão no estado de energia mais baixo pode ser promovido ao estado de maior energia se se fornecer energia necessária de modo a observar a condição de ressonância, que é traduzida pela expressão:

$$\Delta E = h \nu = g \beta_e H_0 \quad eq. 4$$

em que h é a constante de Planck e ν é a frequência da radiação eletromagnética que induz a transição (neste caso na zona das microondas do espectro eletromagnético). Assim, esta equação descreve a absorção de energia entre dois estados de spin. Num espectrómetro de RPE, utiliza-se habitualmente um a fonte de microondas de frequência fixa e é realizado um varrimento de campo magnético de forma a medir a energia necessária para se inverter o spin do electrão [61].

Os núcleos também possuem momento angular de spin e o seu valor é dado pelo spin nuclear I que pode apresentar valores de $0, 1/2, 1, 3/2, \dots$, determinado pelo número de prótons e neutrões que possuem. O momento magnético é dado por:

$$\mu_n = g_n \beta_n I \quad eq. 5$$

em que β_n é o magnetão nuclear. Os níveis de energia são quantificados e os valores do número quântico M_I , variam de $-I$ a $+I$, ou seja apresentam $2I+1$ valores. O campo magnético sentido pelo eletrão é assim o campo magnético externo ao qual se adiciona ou subtrai o campo magnético criado pelos núcleos vizinhos (figura 14) [49, 61].

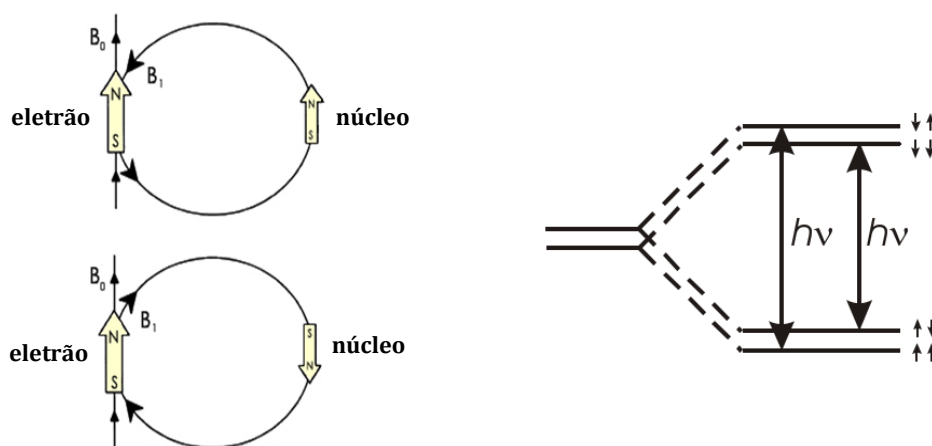


Figura 14 - Esquema representativo de um átomo sujeito a um campo magnético externo e a interação do spin eletrónico e do spin nuclear.

Este efeito é designado por interação nuclear hiperfina e permite identificar os núcleos na vizinhança do eletrão desemparelhado. Na figura 14 (à direita) está representado um esquema da interação nuclear hiperfina [49, 61].

Quando existe esta interação as regras de seleção são $\Delta M_I = 0$ e $\Delta M_S = 1$ pelo que um núcleo de spin I origina $2I+1$ transições que, na primeira aproximação, são espaçadas de um valor de campo magnético designado por A . A diferença de energia entre os níveis M_I é designada por acoplamento hiperfino e A por constante de acoplamento hiperfino [49].

Para complexos de vanádio (IV) torna-se especialmente útil a utilização de RPE, dado que é uma espécie paramagnética, com $S = 1/2$ correspondente à configuração eletrónica [Ar]3d¹ do catião metálico.

O núcleo de vanádio, ^{51}V tem spin nuclear $I = 7/2$ e como resultado das interações do eletrão desemparelhado com spin nuclear verifica-se o desdobramento dos níveis de spin eletrónico em $2I + 1$ níveis de energia que origina oito bandas no espectro de RPE (figura 15) [90].

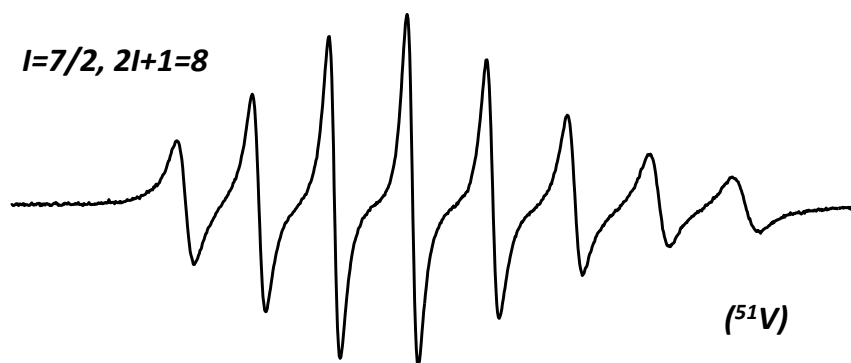


Figura 15 - Espectro de RPE representativo de (^{51}V) em solução aquosa e registrado à temperatura ambiente (adaptado de [91]).

Para espécies em solução os espectros de RPE são, geralmente, isotrópicos, onde as três direções do espaço são equivalentes, assim há apenas um valor para o fator g e um valor para a constante de acoplamento hiperfino A (g_{iso} e A_{iso}), não dependendo da orientação da amostra em relação ao campo magnético externo. Esta situação pode ser alterada por efeito da temperatura ou de outros fatores que alterem a mobilidade da amostra levando à dependência dos parâmetros g e A [49]. Assim com amostras em matriz gelada os espectros de RPE são, geralmente, anisotrópicos, em que a obtenção dos valores de g e A é mais complexa, podendo existir três componentes em g (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) e três em A (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}), de acordo com a orientação da molécula no campo magnético. Estes parâmetros fornecem informação sobre a esfera e geometria de coordenação [49, 90].

A partir dos espectros de RPE é possível obter informações importantes uma vez que as espécies paramagnéticas exibem um espectro característico, correspondente às oito bandas. Assim a existência de um sinal RPE, permite concluir que existe em solução pelo menos uma espécie paramagnética (vanádio (IV)), não sendo possível detectar a presença de espécies diamagnéticas (vanádio (V)), que possuem uma configuração eletrônica $[\text{Ar}]3d^0$ e como tal não apresentam sinal em RPE. Por outro lado, a inexistência de sinal de RPE permite chegar à conclusão de que não existem espécies paramagnéticas em solução, nada podendo concluir quanto à existência de espécies diamagnéticas. Deste modo, é possível detectar a ocorrência de reações de oxidação/redução em solução e assim saber se os complexos formados correspondem a vanádio (IV) ou se este foi oxidado a vanádio (V).

4.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A teoria subjacente a uma experiência de RMN é muito semelhante à de RPE, mas a configuração é muito diferente, por razões técnicas. Em RPE, verifica-se a transição de moléculas a partir do seu estado fundamental para um estado excitado, por radiação de microondas, sendo detectada pela absorção de energia correspondente. Por outro lado, a RMN utiliza pulsos de radiofrequência que permitem a passagem das moléculas para um estado excitado e, de seguida, monitoriza o sinal correspondente ao regresso para o estado

fundamental. Este sinal é então submetido a uma transformação de Fourier para se obter o espectro de RMN [92].

Para o estudo de espécies diamagnéticas, como vanádio (V), pode utilizar-se a espectroscopia de RMN para a sua caracterização. O ^{51}V é um núcleo com características espectroscópicas favoráveis à sua observação por RMN. Na verdade, existe uma abundância natural, de 99,76%, e possui um momento magnético elevado ($\mu=5,139$ unidades de magnetão nuclear), apresentando grande sensibilidade de deteção. Como referido anteriormente o núcleo de vanádio, ^{51}V tem spin nuclear $I = 7/2$ e um momento quadrupolar de $0,24 \times 10^{-28} \text{ m}^{-2}$, originando sinais, que embora largos são perfeitamente observáveis [90].

Todas estas características fazem com que a recetividade de RMN do núcleo ^{51}V seja excepcionalmente elevada, permitindo a observação rápida de espectros com boa razão sinal/ruído, cujos parâmetros espectrais, especialmente o desvio químico (δ) dos sinais, fornecem informação importante quanto às espécies de vanádio existentes em solução, nomeadamente o seu estado de oxidação, número de coordenação e interações eletrónicas [90].

Capítulo II – Metodologia Experimental

Capítulo II: Metodologia Experimental

Neste capítulo descrevem-se os métodos, as condições e execuções experimentais, instrumentação e reagentes utilizados. Faz-se ainda referência aos programas computacionais com os quais se efetuaram os cálculos ou tratamentos necessários para a análise dos resultados.

1. Reagentes, soluções e instrumentação

Os reagentes utilizados foram adquiridos à Sigma-Aldrich, e os solventes utilizados foram adquiridos à Merck, sem purificação adicional.

Os lípidos, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, armazenados a -18°C e utilizados sem qualquer purificação adicional.

A solução tampão utilizada em todos os ensaios (Tampão MOPS) foi preparada a partir da pesagem rigorosa do ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico, adquirido à Sigma, na concentração 10mM, pH 7,4 e força iónica ajustada a 0,1M com NaCl.

As soluções concentradas de ligandos e complexos de vanádio utilizadas foram preparadas em MOPS, dimetilsufóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), diclorometano (CH₂Cl₂), diclorometano-tolueno (1:1) (CH₂Cl₂-tol) e dimetilsufóxido-tolueno (1:6) (DMSO-tol) e armazenadas a 4°C e ao abrigo da luz. Os ligandos e os complexos estudados encontravam-se já preparados pelo grupo de investigação, existindo armazenados no laboratório.

As suspensões de lipossoma foram preparadas em tampão, mantidas a 4°C ao abrigo da luz e diluídas em tampão MOPS sempre que necessário.

As suspensões de lipossoma multilamelares (MLV's) foram extrudidas (para originar as unilamelares) num extrusor Lipex Biomembranes de capacidade 10mL e filtros de policarbonato da Nucleopore-Corning (100nm).

Os estudos de tamanho dos lipossomas foram realizados por Dispersão Dinâmica da Luz (DLS) num Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments.

Os espectros de RPE, utilizados para os estudos de caracterização, oxidação e localização dos complexos de vanádio nos diferentes solventes e em lipossomas foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética, no Centro de Estudos de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) e registados num aparelho Bruker ELEXSYS E 500, equipado com um sistema de temperatura controlada ER 4B1 VT. As amostras utilizadas na obtenção dos espectros de RPE foram colocadas em tubos capilares e posteriormente em tubos de quartzo (diâmetro=4 mm).

Os espectros de RPE foram adquiridos usando os programas padrão do software do aparelho (XEPR).

Os espectros de RMN utilizados para os estudos de caracterização, oxidação e localização dos complexos de vanádio nos lipossomas e MOPS, foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, no Centro de Estudos de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), utilizando um espectrómetro Bruker Avance III 400 (400,15 MHz para ^1H e 105,20 MHz para ^{51}V). O calibrante utilizado foi o VOCl_3 e os desvios químicos são expressos em δ (ppm). As amostras utilizadas na obtenção dos espectros de RMN foram colocadas em tubos de vidro do tipo 1 classe B (diâmetro=5 mm) comumente referidos como N-51A.

Os espectros de RMN foram adquiridos usando o software TopSpin 3.1, Bruker.

Para um dos complexos de vanádio foi feito um estudo por espectroscopia de UV-Vis com soluções preparadas em tampão MOPS, DMSO e H_2O , traçaram-se espectros de variação de absorvância em função do comprimento de onda (250-1100 nm). Os espectros de UV-Vis foram obtidos num espectrofotómetro de feixe duplo UV-3600|Shimadzu UV-VIS-NIR a 25°C.

Os espectros de UV-Vis foram adquiridos usando os programas padrão do software do aparelho (UVProbe 2.3.3).

Todas as pesagens foram efetuadas numa balança analítica Mettler AT201 ($\pm 2 \times 10^{-5}\text{g}$).

2. Preparação de lipossomas

Para a preparação de lipossomas, optou-se pelo processo mais comum de preparação, denominado por método de hidratação do filme lipídico descrito por Bangham [93].

Dissolveu-se o lípido (DMPC e POPC) em clorofórmio, e evaporou-se o solvente orgânico até à secura sob uma corrente de azoto, num balão de fundo redondo. Após a evaporação do solvente orgânico, o filme permaneceu sob vácuo durante 3 horas para eliminar qualquer vestígio de solvente orgânico.

Após 3 horas, hidratou-se o filme preparado com solução tampão MOPS (10mM; pH 7,4; 0,1M NaCl) e agitou-se a suspensão no vortex alternando com imersão num banho de temperatura superior à de transição de fase formando, assim, vesículas multilamelares (MLV's).

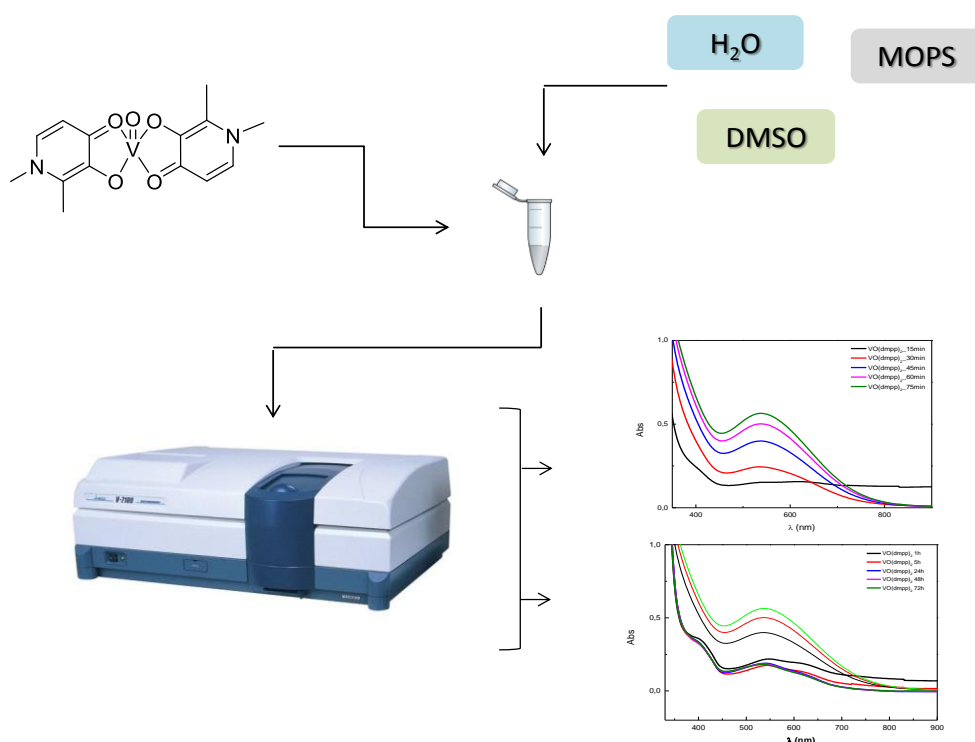
Realizaram-se, então, 10 ciclos de congelação/descongelação (azoto líquido a -196°C / banho termostático a 37°C) e deixou-se a suspensão final estabilizar, durante 30min, num banho termostaticado a 37°C . Após o período de estabilização fez-se passar a suspensão lipídica de MLV's pelo extrusor. A extrusão foi realizada a 37°C , a uma pressão de 250 bar em atmosfera inerte (corrente de árgon) fazendo passar a suspensão de lipossoma por filtros de policarbonato de diâmetro de 100nm, 10 vezes.

No final a suspensão lipídica exhibe um aspeto translúcido e é constituída por lipossomas unilamelares com $\simeq 100$ nm de diâmetro, confirmado por Dispersão Dinâmica da Luz.

3. Caracterização do complexo de vanádio VO(dmpp)₂ nos solventes DMSO, MOPS e H₂O por espectroscopia de UV-Vis

Para o complexo de vanádio VO(dmpp)₂ prepararam-se soluções de 1mL em DMSO, MOPS e H₂O, devidamente desarejados sob uma corrente de argônio, de modo a obter uma concentração final de amostra de 1,5mM. As amostras foram preparadas por dissolução do composto a estudar no respetivo solvente. Agitou-se em vortex cada solução, durante 1 minuto, e traçaram-se espectros de variação de absorvância em função do comprimento de onda (250-1100 nm) e ao longo do tempo (com a duração de 72 horas). A linha de base foi traçada em DMSO, MOPS e H₂O, respectivamente. O procedimento encontra-se resumido no esquema 1.

Os espectros foram tratados com o programa Origin 8.5.0.



Esquema 1 – Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de Espectroscopia UV/visível.

4. Estudo e caracterização de complexos de vanádio em diferentes solventes por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e 100K

A síntese dos diferentes complexos de vanádio descritos nesta dissertação foi realizada anteriormente no nosso Laboratório, seguindo o protocolo adotado para a síntese de complexo dos ligandos derivados das 3,4-HPO com diferentes metais [33].

Prepararam-se soluções de 1mL de cada complexo de vanádio com os diferentes solventes ou mistura de solventes devidamente desarejados (MOPS, DMSO, DMF CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol (1:6)), de modo a obter uma concentração final de amostra de 1,5mM. As amostras foram preparadas por dissolução do composto a estudar no respetivo solvente. Agitou-se em vortex cada solução, durante 1 minuto. As amostras de RPE a 100 K foram congeladas em azoto líquido no capilar, logo após preparação.

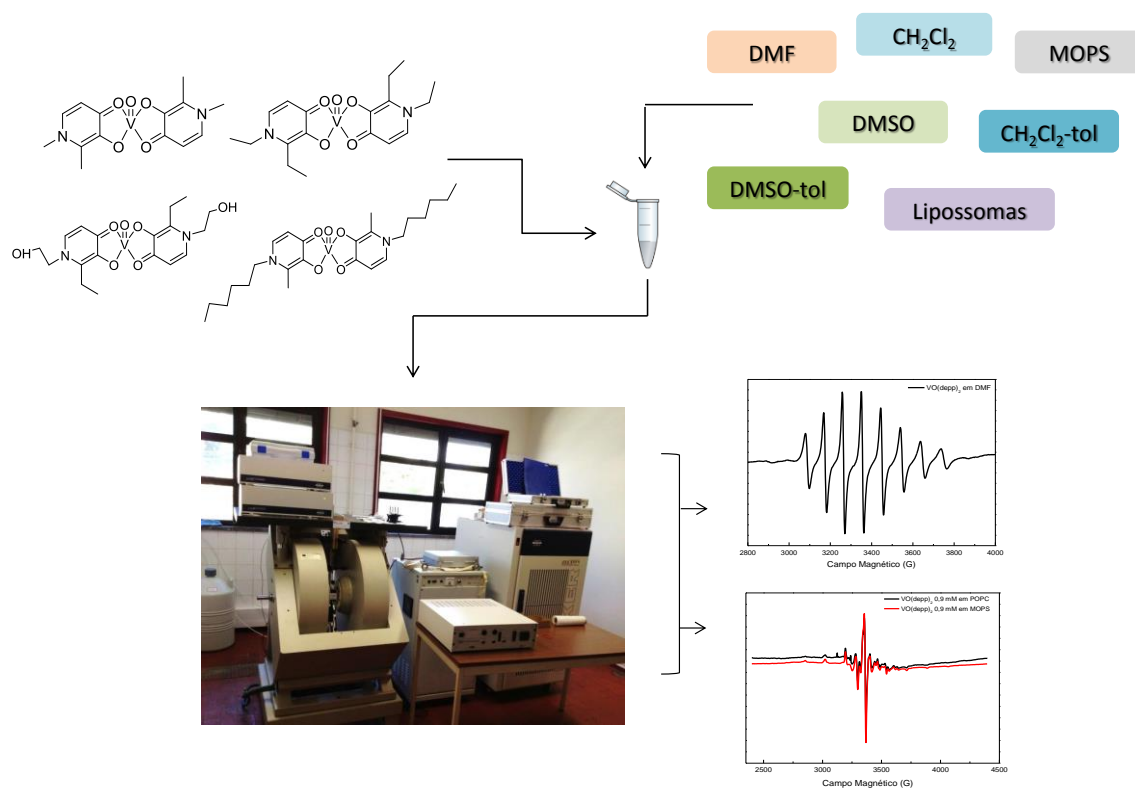
A análise de todas as soluções foi efetuada de seguida a temperatura ambiente e 100K por RPE.

As condições de aquisição para RPE a temperatura ambiente foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 4 G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 400ms, janela de 1200G (2800G a 4000G), potência de 31,7 mW, 1 varrimento e temperatura de $296 \pm 2\text{K}$.

As condições de aquisição para RPE a 100K foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 8 G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 400 ms, janela de 2000G (2400G a 4400G), potência de 31,7 mW, 1 varrimento e temperatura de $100 \pm 2\text{K}$.

Os espectros foram tratados com o programa Origin 8.5.0. e os valores de parâmetros de Hamiltoniano de Spin foram calculados após simulação espectral com o programa WinEpr/SimFonia, Bruker.

O procedimento encontra-se resumido no esquema 2.



Esquema 2 - Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de Espetroscopia de RPE.

5. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de DMPC por espectroscopia de RPE a 100 K

Os estudos foram igualmente realizados de acordo com os procedimentos anteriormente descritos.

Prepararam-se alíquotas de 1mL de suspensão de lipossoma de DMPC (4mM, 8mM e 12mM) às quais se adicionou o composto a estudar, de modo a obter uma concentração de composto de 1,5mM. Agitou-se em vortex cada solução ao abrigo da luz, durante 1minuto e procedeu-se à incubação num banho a 37°C, durante 1 hora, posteriormente congelaram-se as amostras em azoto líquido.

Esta experiência foi repetida para diferentes tempos de incubação: 30 min, 1h, 1h e 30min, 2h e 2h e 30 min.

A análise de todas as amostras foi feita de seguida a 100K por RPE.

As condições de aquisição foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 8 G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 400 ms, janela de 2000G (2400G a 4400G), potência de 31,7 mW, 1 varrimento e temperatura de 100 ± 2 K.

Os espectros foram tratados com o programa Origin 8.5.0. e os valores de parâmetros de Hamiltoniano de Spin foram calculados após simulação espectral com o programa WinEpr/SimFonia, Bruker.

O procedimento encontra-se resumido no esquema 2.

6. Estudo do complexo VO(dmpp)₂ em MOPS e em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE e de RMN a temperatura ambiente

Prepararam-se alíquotas de 1mL de MOPS e de suspensão de lipossoma de POPC (8mM) às quais se adicionou o complexo VO(dmpp)₂, de modo a obter uma concentração de composto de 1,5mM. Agitou-se em vortex cada solução ao abrigo da luz, durante 1 minuto.

A análise de todas as amostras foi realizada de seguida por RPE e RMN a temperatura ambiente e ao longo do tempo (3 horas no total).

Para RMN, às amostras foram adicionadas duas gotas de água deuterada (D₂O) de modo a facilitar a aquisição dos espectros. Os espectros foram obtidos a 26°C.

Mais ainda, foram preparadas soluções de 1mL de diferentes concentrações (1,5mM; 0,15mM e 0,015mM) do complexo de vanádio VO(dmpp)₂, por dissolução do composto em MOPS, seguida de análise por RPE e RMN à temperatura ambiente.

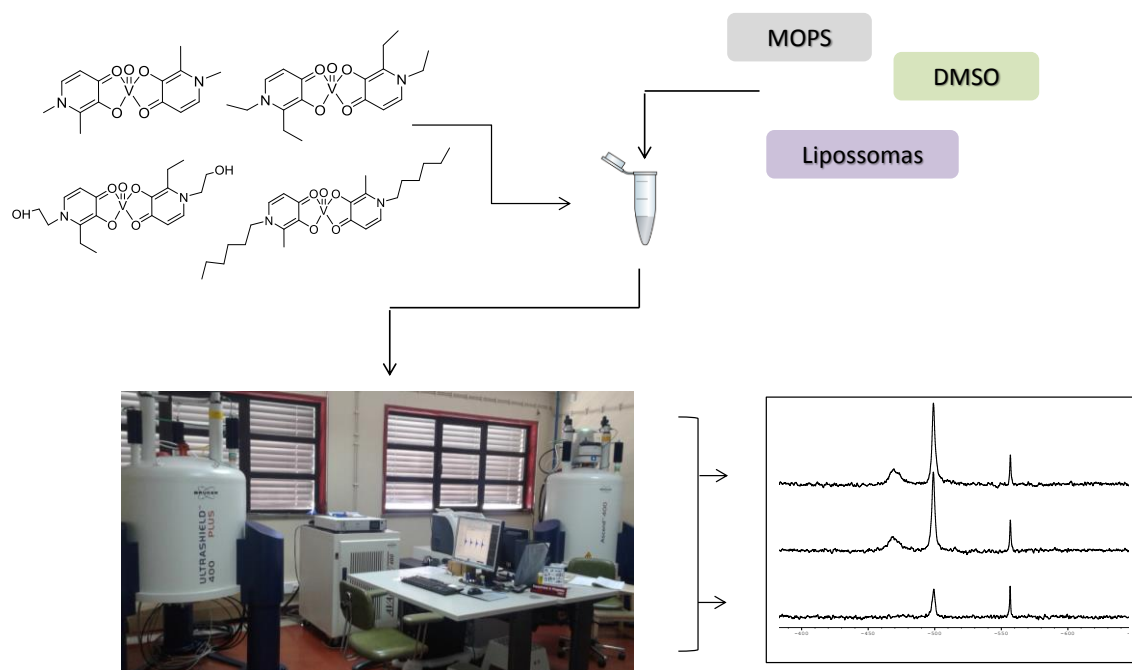
As condições de aquisição para RPE a temperatura ambiente foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 4G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 200 ms, janela de 1200G (2800G a 4000G), potência de 31,7 mW, 3 varrimentos e temperatura de 296 ± 2K.

Os espectros foram tratados com o programa Origin 8.5.0. e os valores de parâmetros de Hamiltoniano de Spin foram calculados após simulação espectral com o programa WinEpr/SimFonia, Bruker.

As condições de aquisição para RMN foram: sonda 5mm PABBO BB-1H/D, janela de 400 ppm, temperatura ambiente de 26°C, 12 K varrimentos e a linha de base de 50 Hz.

Os espectros foram tratados com o programa TopSpin 3.1, Bruker.

O procedimento encontra-se resumido nos esquemas 2 e 3.



Esquema 3 – Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de Espetroscopia de RMN.

7. Estudo de complexos de vanádio em MOPS por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente

Prepararam-se alíquotas de 1mL de MOPS às quais se adicionaram volumes crescentes de solução concentrada dos complexos de vanádio em DMSO de modo a obter as concentrações de 0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM (respectivamente, 1, 5, 10 e 15% (V/V) de DMSO). As soluções concentradas foram preparadas por dissolução do composto a estudar no respectivo solvente. Agitou-se em vortex cada microtubo, ao abrigo da luz, durante 1 minuto. Para RPE a 100 K as amostras foram congeladas em azoto líquido, após preparação.

A análise de todas as amostras foi realizada de seguida por RPE à temperatura ambiente e a 100K e por RMN, e ao longo do tempo (0h, 24h e 72h). Para RMN, às amostras foram adicionadas duas gotas de água deuterada (D_2O) de modo a facilitar a aquisição dos espectros. Os espectros foram obtidos a 26°C.

As condições de aquisição para RPE a temperatura ambiente foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modelação de 4G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 400 ms, janela de 1200G (2800G a 4000G), potência de 31,7 mW, 5 varrimentos e temperatura de $296 \pm 2K$.

As condições de aquisição para RPE a 100K foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modelação de 8 G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 400 ms, janela de 2000G (2400G a 4400G), potência de 31,7 mW, 1 varrimento e temperatura de $100 \pm 2K$.

Os espectros foram tratados com o programa Origin 8.5.0. e os valores de parâmetros de Hamiltoniano de Spin foram calculados após simulação espectral com o programa WinEpr/SimFonia, Bruker.

As condições de aquisição para RMN foram: sonda 5mm PABBO BB-1H/D, janela de 400 ppm, temperatura ambiente de 26°C, 12 K varrimentos e a linha de base de 50 Hz.

Os espectros foram tratados com o programa TopSpin 3.1, Bruker.

O procedimento encontra-se resumido nos esquemas 2 e 3.

8. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente

Prepararam-se alíquotas de 1mL de suspensão de lipossoma de POPC (4mM, 8mM e 12mM) às quais se adicionaram volumes crescentes de solução concentrada dos complexos de vanádio em DMSO de modo a obter as concentrações de 0,06mM e 0,9mM. As soluções concentradas foram preparadas por dissolução do composto a estudar em DMSO. Agitou-se em vortex cada microtubo, ao abrigo da luz, durante 1 minuto. Para RPE a 100 K as amostras são congeladas em azoto líquido, após preparação.

A análise de todas as amostras foi realizada de seguida por RPE a temperatura ambiente e 100K, e por RMN, e ao longo do tempo (0h, 24h e 72h). Para RMN, às amostras foram adicionadas duas gotas de água deuterada (D_2O) de modo a facilitar a aquisição dos espectros. Os espectros foram obtidos a 26°C.

As condições de aquisição para RPE a temperatura ambiente foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 4G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 400 ms, janela de 1200G (2800G a 4000G), potência de 31,7 mW, 5 varrimentos e temperatura de $296 \pm 2K$.

As condições de aquisição para RPE a 100K foram: frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 8 G, ganho de 60 dB, tempo de aquisição de 400 ms, janela de 2000G (2400G a 4400G), potência de 31,7 mW, 1 varrimento e temperatura de $100 \pm 2K$.

Os espectros foram tratados com o programa Origin 8.5.0. e os valores de parâmetros de Hamiltoniano de Spin foram calculados após simulação espectral com o programa WinEpr/SimFonia, Bruker.

As condições de aquisição para RMN foram: sonda 5mm PABBO BB-1H/D, janela de 400 ppm, temperatura ambiente de 26°C, 12 K varrimentos e a linha de base de 50 Hz.

Os espectros foram tratados com o programa TopSpin 3.1, Bruker.

O procedimento encontra-se resumido nos esquemas 2 e 3.

9. Avaliação do efeito da presença de diferentes quantidades de DMSO em lipossomas de POPC por DLS e por espectroscopia de RMN

Prepararam-se alíquotas de 1mL de suspensão de lipossoma de POPC (8mM) às quais se adicionaram volumes crescentes de DMSO (1%, 5%, 10% e 15%).

As soluções foram preparadas por adição das quantidades adequadas de lipossoma ao DMSO. Agitou-se em vortex cada microtubo, ao abrigo da luz, durante 1 minuto.

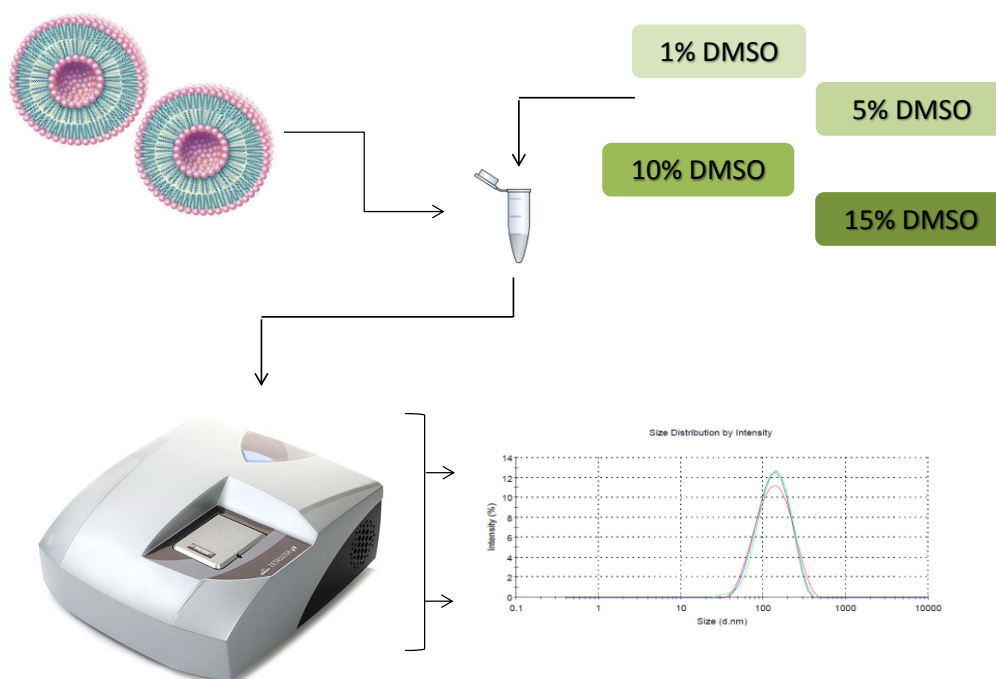
A análise de todas as amostras foi feita de seguida por DLS. As condições de aquisição foram: tempo de aquisição de 120 segundos, 3 varrimentos e temperatura ambiente.

As amostras foram ainda analisadas no que respeita à integridade dos lipossomas através da aquisição dos espectros de RMN de ^1H . Às amostras foram adicionadas duas gotas de água deuterada (D_2O) de modo a facilitar a aquisição dos espectros. Os espectros foram obtidos a 26°C .

As condições de aquisição para RMN foram: sonda 5mm PABBO BB-1H/D, janela de 16 ppm, temperatura ambiente de 26°C , 16 varrimentos e a linha de base de 0,5 Hz.

Os espectros foram tratados com o programa TopSpin 3.1, Bruker.

O procedimento encontra-se resumido nos esquemas 3 e 4.



Esquema 4 – Representação esquemática do procedimento experimental adotado para os estudos de DLS:

Capítulo III – Resultados e Discussão

Capítulo III: Resultados e Discussão

1. Caracterização do complexo de vanádio $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ nos solventes DMSO, MOPS e H_2O por espectroscopia de UV-Vis

O complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ com o ligando Hdmpp foi o composto escolhido para iniciar este estudo uma vez que o complexo de zinco, $\text{Zn}(\text{dmpp})_2$, com o mesmo ligando demonstrou ser um dos mais promissores a ser explorado como agente capaz de diminuir os níveis de glicose no tratamento da *Diabetes Mellitus* tipo I em estudos experimentais com animais [16].

Para o complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ pretendeu-se confirmar alguns resultados obtidos anteriormente em estudos realizados pelo grupo de Investigação onde se insere esta Dissertação [6, 8, 28] e alargar este estudo a outras técnicas espectroscópicas, condições experimentais e também a outros complexos de vanádio.

Em primeiro lugar foi feito um estudo por espectroscopia de UV/Vis, a fim de avaliar as possíveis interações com os solventes (DMSO, MOPS e H_2O) sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Os espectros em condições aeróbicas foram obtidos de acordo com o anteriormente descrito e são caracterizados por quatro bandas de absorção na região do visível [6, 8, 28]. Sob condições aeróbicas, este complexo sofre oxidação, acompanhada pela alteração da cor das soluções (sob condições anaeróbicas $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ exibe cor azul enquanto que sob condições aeróbicas exibe cor violeta em MOPS e DMSO e cor amarela em H_2O), confirmada pelas alterações observadas nos espectros UV/Vis. Em condições anaeróbicas, este complexo permanece no estado de oxidação IV. À medida que aumenta o tempo de exposição, aumenta também a quantidade de espécie oxidada deste complexo em todos os solventes, tendo sido registados os espectros após 24, 48 e 72 horas. Contudo a velocidade de oxidação é dependente do solvente, sendo quase instantânea em H_2O , ligeiramente mais lenta em MOPS e bastante mais lenta em DMSO. Estas alterações são observadas nos espectros UV/Vis que passam a exibir uma banda cada vez mais larga.

Com a espectroscopia de UV/Vis é possível observar a oxidação deste complexo ao longo do tempo, contudo não se obtém a informação pretendida, uma vez que não é possível uma caracterização das espécies de vanádio presentes nas diferentes soluções. Por este motivo a oxidação será seguida por espectroscopia de RPE e de RMN.

2. Estudo e caracterização de complexos de vanádio em diferentes solventes por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e 100K

Na sequência do trabalho realizado no nosso grupo de Investigação com complexos de cobre (II) [31], utilizou-se a espectroscopia de RPE para caracterizar os complexos de vanádio: $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ em solução, e nos solventes ou misturas: MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol (1:6).

No que respeita à solubilidade destes complexos nos diferentes solventes os resultados estão resumidos na tabela seguinte (tabela 6).

Tabela 6 – Solubilidade dos complexos de vanádio nos diferentes solventes.

	$\text{VO}(\text{dmpp})_2$	$\text{VO}(\text{depp})_2$	$\text{VO}(\text{hepp})_2$	$\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$
MOPS				
DMSO				
DMF				
CH_2Cl_2				
CH_2Cl_2-tol				
DMSO-tol				

Legenda:

	Solúvel
	Solubilidade intermédia
	Não solúvel

Analisando os dados da tabela, verifica-se que, o complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ apresenta solubilidade intermédia em todos os solventes, tendo sido possível observar a existência de alguma suspensão em todos os solventes. Os complexos $\text{VO}(\text{depp})_2$ e $\text{VO}(\text{hepp})_2$ são os que possuem melhor solubilidade nos vários solventes e o complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ apenas não é solúvel em MOPS.

De modo a obter informação sobre o comportamento em solução destes complexos, obtiveram-se espectros de RPE à temperatura ambiente, que se encontra registada na figura 16 para o complexo $\text{VO}(\text{depp})_2$ e no anexo 1 para os restantes complexos. Os espectros obtidos revelam a presença de uma só espécie em solução, e são semelhantes entre si, com a exceção da largura de banda.

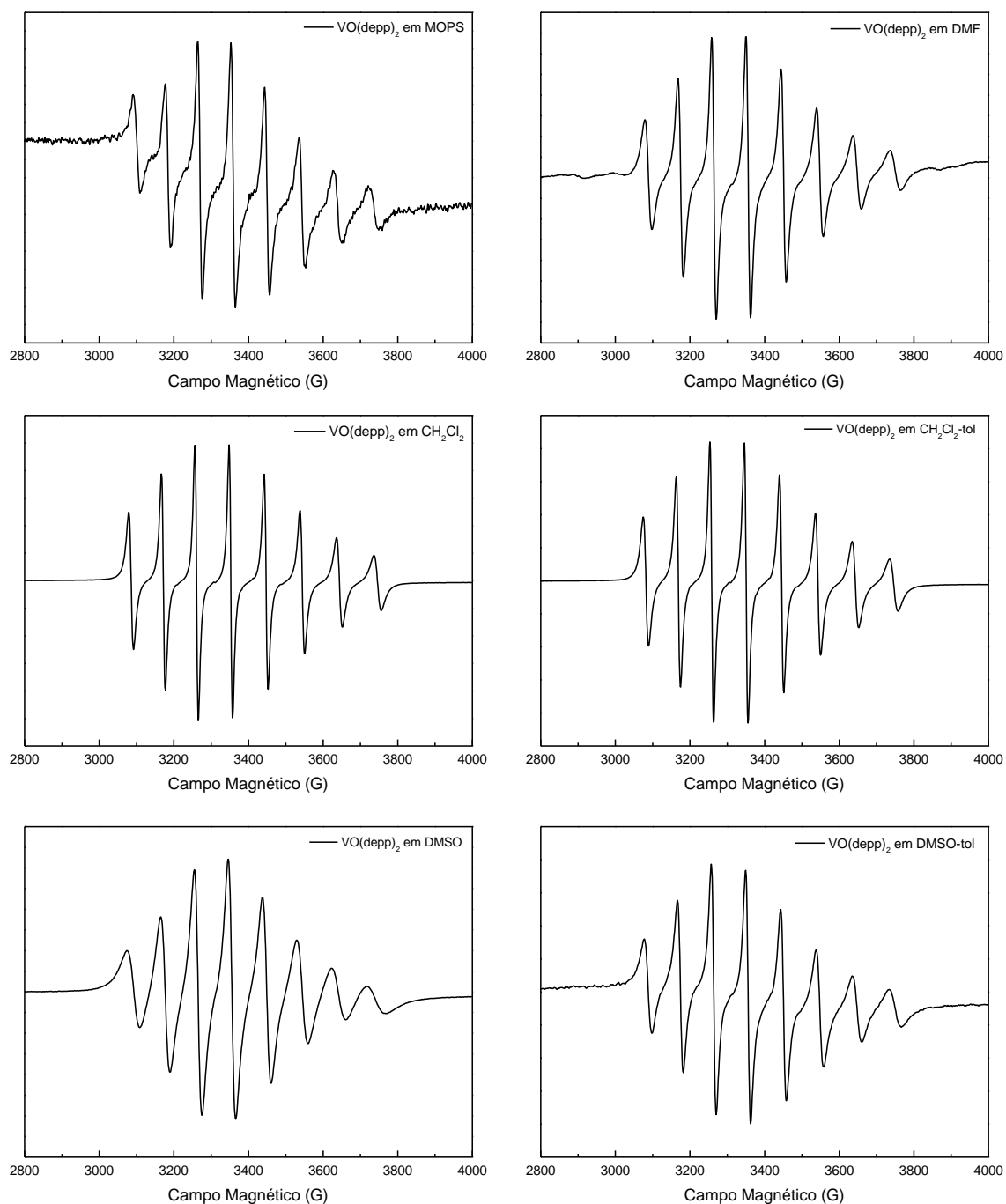


Figura 16 – Espetros de RPE do complexo VO(depp)₂ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)) à temperatura ambiente.

O perfil dos espectros de RPE obtidos é o esperado para este tipo de complexos, onde é possível observar o sinal correspondente à interação do elétron desemparelhado ($S = 1/2$) com o núcleo de vanádio, que possui um valor de $I = 7/2$, o que se traduz em oito linhas observáveis nos espectros de RPE.

De modo a obter os valores de g_{iso} e A_{iso} (tabela 7) para os vários complexos de vanádio, foram realizadas simulações computacionais dos espectros adquiridos.

Tabela 7 – Parâmetros de Hamiltoniano de Spin para os complexos de vanádio (IV).

Complexos	Solvente	Valor de g_{iso}	Valor de A_{iso} (10^{-4} cm^{-1})
VO(dmpp)₂ VO(depp)₂ VO(hepp)₂ VO(hexylmpp)₂	MOPS	1,972	85
	DMSO	1,976	87
	DMF	1,971	87
	CH₂Cl₂	1,971	87
	CH₂Cl₂-tol	1,971	87
	DMSO-tol	1,976	87

Analizando os valores dos parâmetros de RPE obtidos por simulação dos espectros experimentais, tabela 7, verifica-se que os valores de g_{iso} e A_{iso} encontrados são idênticos para todos os compostos, apresentando valores ligeiramente diferentes de acordo com o solvente. Esta semelhança de valores indica que a espécie de vanádio presente em solução é a mesma em todos os solventes, originando o complexo na forma VOL_2 .

De modo a melhor caracterizar a estrutura eletrônica destes complexos, obtiveram-se espectros de RPE, em condições de matriz gelada, a 100 K, registrando-se na figura 17 o espectro para o $\text{VO}(\text{depp})_2$ e os restantes complexos no anexo 2.

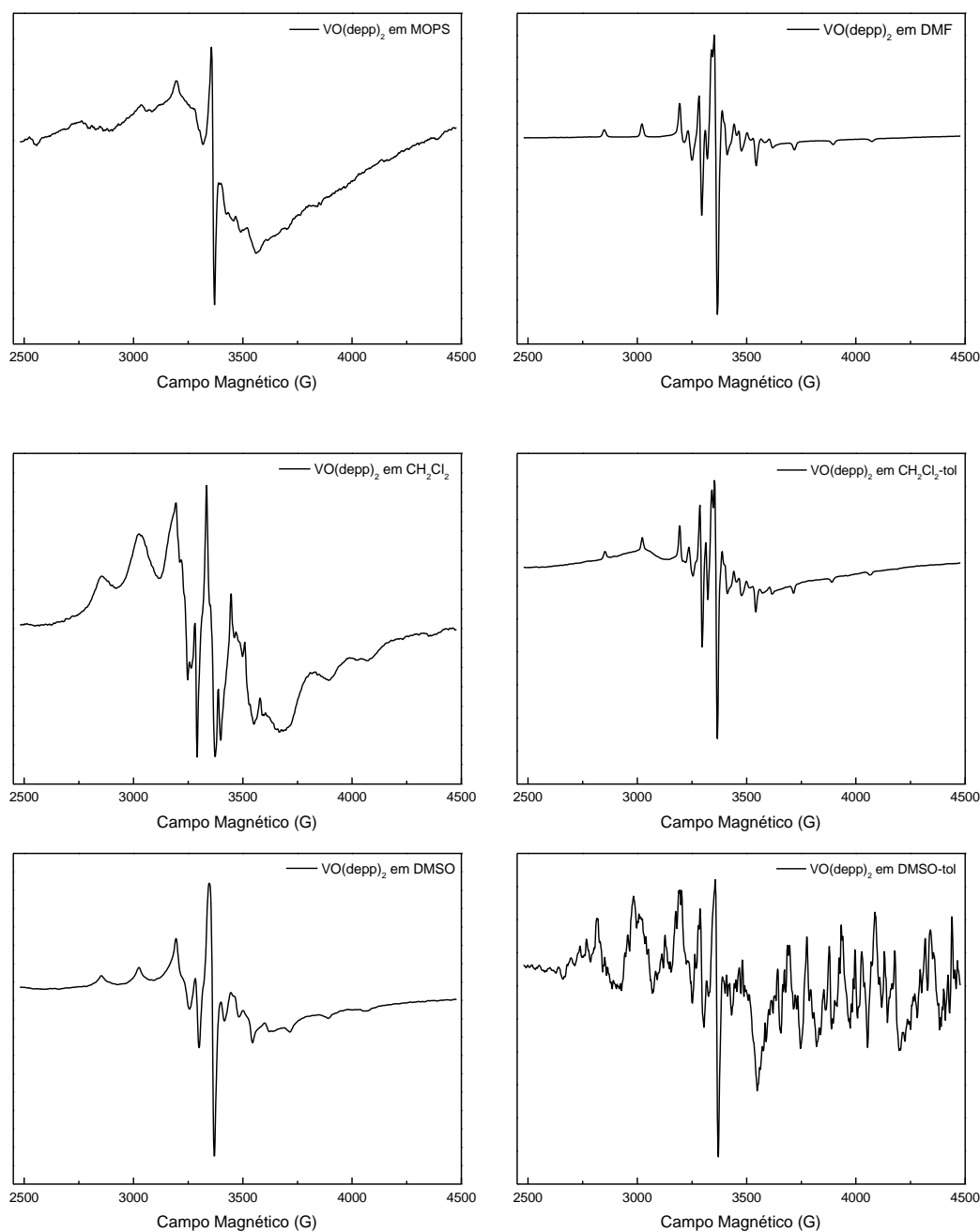


Figura 17 – Espectros de RPE dos complexos $\text{VO}(\text{depp})_2$ nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-tol}$ (1:1) e DMSO-tol(1:6)) a 100 K.

Os espectros em DMF, DMSO e $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-tol}$ são bem resolvidos e permitiram a obtenção dos valores de g (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) e A (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}) (tabela 8) por simulação computacional dos espectros adquiridos.

Tabela 8 – Parâmetros de Hamiltoniano de Spin para os complexos de vanádio (IV).

Solvente	Complexo	Valor de g			Valor de A (10^{-4} cm^{-1})		
		g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
DMF DMSO CH ₂ Cl ₂ -tol	VO(dmpp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,20	160
	VO(depp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,20	160
	VO(hepp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,20	160
	VO(hexylmpp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,20	160

Analisando os valores dos parâmetros de RPE obtidos por simulação dos espectros experimentais, tabela 8, verifica-se que os valores de g e A encontrados são idênticos para os solventes: DMF, DMSO e CH₂Cl₂-tol. Estes valores estão de acordo com os valores publicados para os complexos de VO(IV) com 3,4-HPO [26] e confirmam a presença da espécie VOL₂ com geometria bipiramidal quadrada. Para os complexos de vanádio com os restantes solventes (MOPS, CH₂Cl₂ e DMSO-tol) não foi possível obter os valores de g e A , pois os espectros adquiridos não tinham resolução suficiente para serem simulados.

3. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de DMPC por espectroscopia de RPE a 100 K

Para a caracterização dos complexos $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ em lipossomas de DMPC, em que a concentração de lípido é 4mM, 8mM e 12mM, tendo os compostos sido sujeitos a diferentes tempos de incubação (30 min, 1h, 1h e 30min, 2h e 2h e 30 min), e foi utilizada a espectroscopia de RPE a 100K.

No que respeita à solubilidade destes complexos em lipossomas DMPC, os resultados estão resumidos na tabela seguinte (tabela 9).

Tabela 9 - Representação colorimétrica da solubilidade dos complexos de vanádio em lipossomas de DMPC.

	$\text{VO}(\text{dmpp})_2$	$\text{VO}(\text{depp})_2$	$\text{VO}(\text{hepp})_2$	$\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$
DMPC				

Legenda:

	Solúvel
	Solubilidade intermédia
	Não solúvel

Analisando os dados da tabela, verifica-se que, o complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$ é solúvel em lipossomas de DMPC. Os complexos $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ e $\text{VO}(\text{depp})_2$ apresentam solubilidade intermédia, verificando-se a existência de composto em suspensão. O complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ não é solúvel em lipossomas de DMPC, ficando em suspensão.

Os espectros registados a 100 K para as diferentes soluções/suspensões estão registados na figura 18. Os espectros apresentados dizem respeito a lipossomas de DMPC 8mM, pois os espectros com lipossomas de 4mM, 8mM e 12mM eram muito semelhantes entre si, optando-se pela concentração de 8mM que possuíam melhor resolução espectral. Quanto ao tempo de incubação, optou-se por 1 hora, devido ao fato de o processo de oxidação estar a decorrer ao longo do tempo, afetando a caracterização destes complexos quanto ao processo oxidativo.

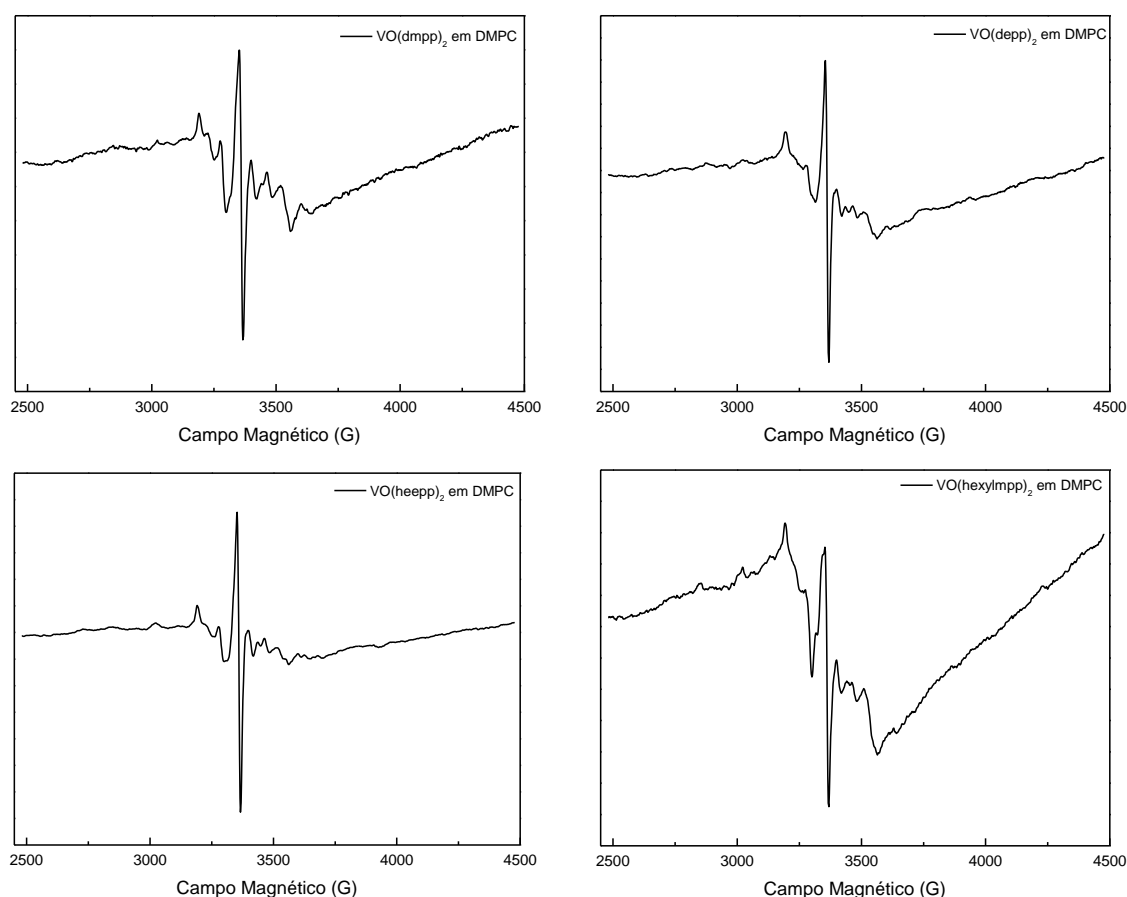


Figura 18 – Espectros de RPE dos complexos de vanádio em lipossomas de DMPC 8mM, a 100 K.

O complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$ é o que apresenta um sinal com melhor resolução, tal como esperado pela observação dos espectros anteriormente representados (figura 18). No entanto não é possível determinar os valores dos parâmetros de Hamiltoniano de Spin g (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) e A (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}).

Com a análise destes espectros pretendia-se estabelecer a localização, nas fases aquosas e lipídicas, destes complexos e obter informações sobre a lipofilicidade/hidrofiliicidade dos mesmos. Devido à temperatura de transição de fase do DMPC (24°C), era necessário um período adicional de tempo de incubação de modo a que a membrana se encontra-se em fase fluída. Consequentemente, durante este tempo ocorre o processo de oxidação dos complexos de vanádio comprometendo assim a aquisição dos espectros de RPE e influenciando o sistema em estudo.

Assim optou-se pela utilização de outros lipossomas, que fossem constituídos por lípidos com uma temperatura de transição menor e cujas condições de aquisição em RPE fossem reproduzíveis à temperatura ambiente, permitindo assim o controlo dos parâmetros. Para este efeito foram preparados lipossomas de POPC cuja temperatura de transição de fase é -2°C.

Este estudo permitiu no entanto o estabelecimento da concentração de lípido ideal da solução destes complexos em lipossomas, e dos parâmetros a utilizar em RPE.

4. Estudo do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em MOPS e em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE e de RMN a temperatura ambiente

O complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ foi o escolhido para iniciar este estudo. Utilizando-se a espectroscopia de RPE e RMN para caracterizar as espécies de vanádio (IV e V) resultantes do complexo de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, ao longo do tempo. Para uma concentração de 1,5mM de complexo registaram-se espectros em MOPS e lipossomas de POPC em condições aeróbicas e ao longo do tempo.

Obtiveram-se ao longo de 3 horas, espectros de RPE à temperatura ambiente (figura 19), onde se pode observar uma diminuição da intensidade do sinal ao longo do tempo, tanto em MOPS como em lipossomas de POPC, devido à ocorrência do processo de oxidação de V(IV) a V(V).

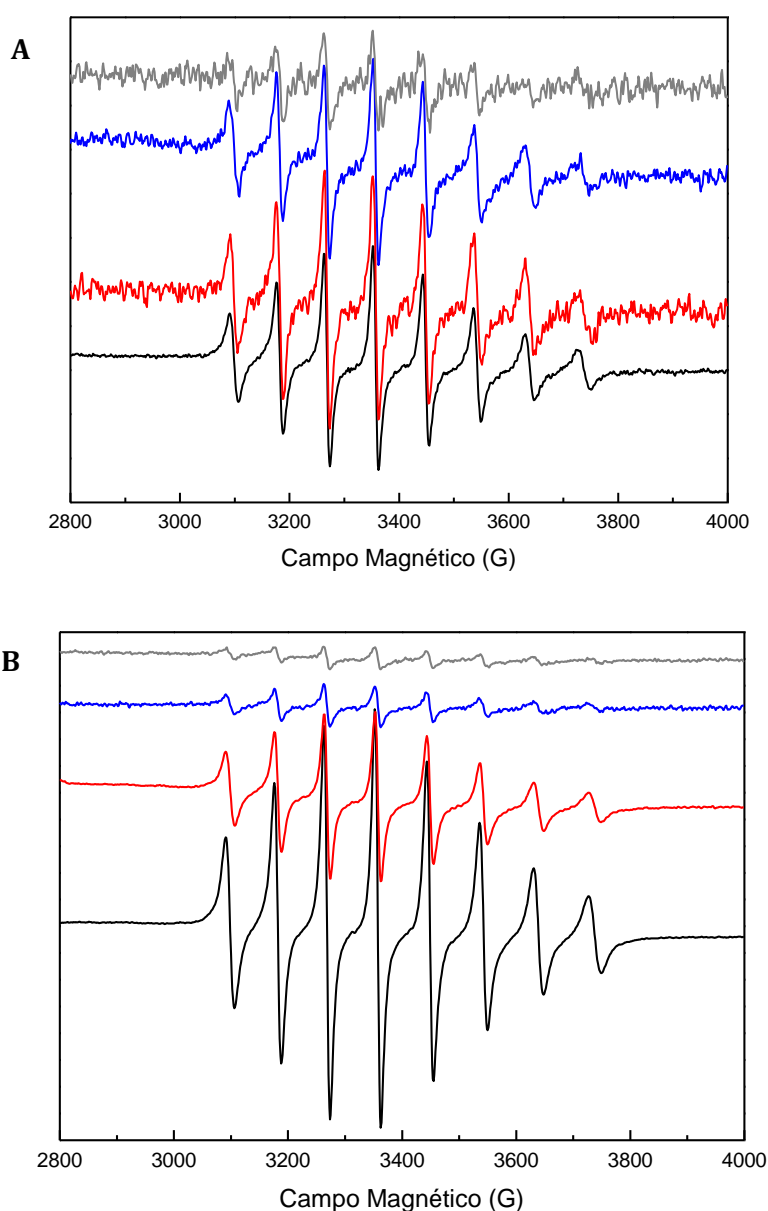


Figura 19- Espectros de RPE de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em MOPS (A) e em lipossomas POPC (B), ao longo do tempo (de baixo para cima, respetivamente às 0h, 1h, 2h e 3h).

No que respeita à solubilidade deste complexo em MOPS e em lipossomas de POPC, verifica-se que este não é totalmente solúvel, sendo possível visualizar a formação de suspensões. Em MOPS há bastante suspensão enquanto que em lipossomas de POPC quase não há suspensão, o que leva a uma concentração efetiva menor do que a calculada, uma vez que não está dissolvido todo o complexo. Através da análise dos espectros observa-se que os espectros em MOPS têm um sinal menos intenso e com mais ruído quando comparados com os espectros em lipossomas de POPC, justificado pela baixa solubilidade do composto.

Afim de caracterizar as espécies de vanádio (V) que se formaram no decorrer do processo de oxidação, obtiveram-se espectros de RMN de ^{51}V à temperatura ambiente (figuras 20, 21). Estes espectros mostram que, a pH fisiológico, a solução de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ tem os mesmos sinais de ^{51}V , que já se encontram descritos na literatura [28], exibindo assim dois sinais bem definidos a -477 ppm e -501 ppm, tanto em MOPS como em lipossomas de POPC. Estes resultados indicam a oxidação do complexo de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, de V(IV) a V(V), com a formação de dois complexos monoméricos de V(V): $[\text{VO}_2(\text{dmpp})_2]$ a -477 ppm e $\text{VO}_2(\text{dmpp})$ a -501 ppm. Surge ainda um sinal menos intenso a -556 ppm que é atribuído à espécie de monovanadato, $\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O})_4$ (tabela 10).

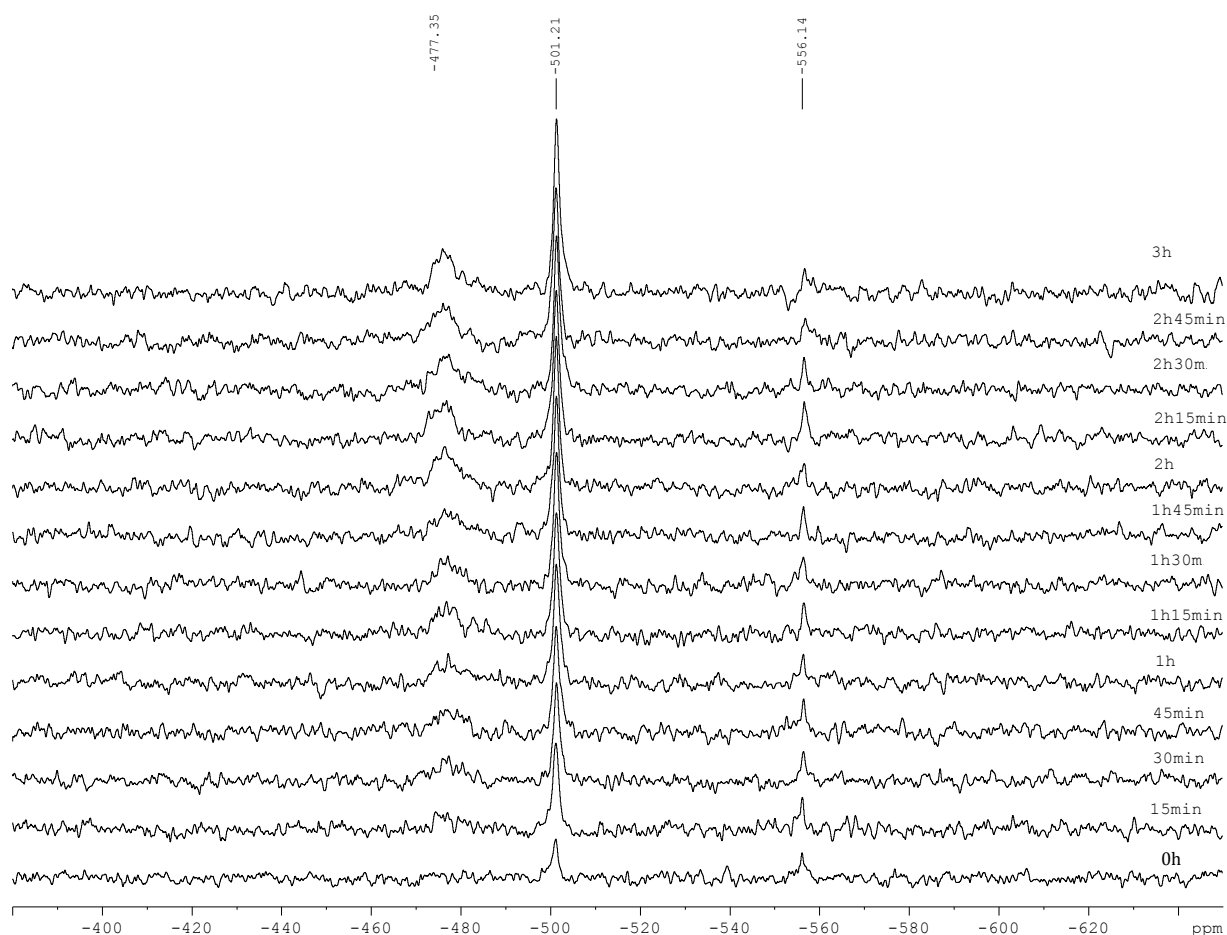


Figura 20 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em MOPS, ao longo do tempo.

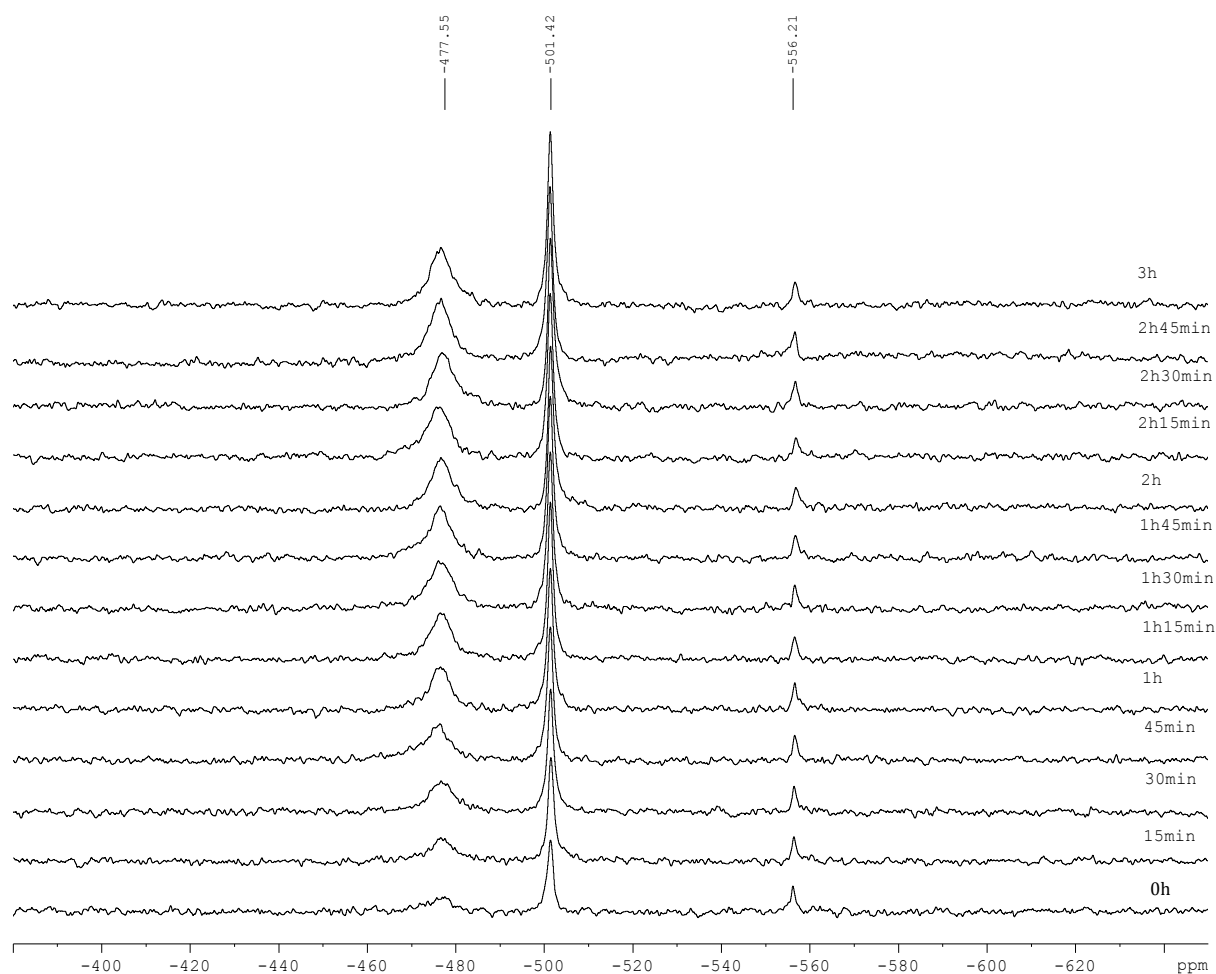
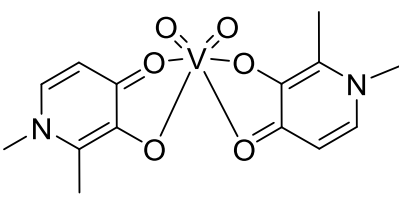
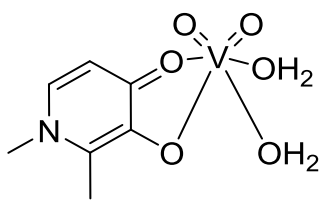
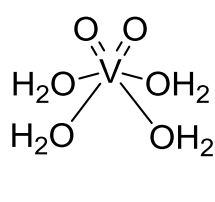


Figura 21 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em lipossomas de POPC, ao longo do tempo.

À semelhança do que se verificou com os espectros de RPE, os espectros de RMN em MOPS têm um sinal com maior ruído e menor resolução quando comparados com os espectros em lipossomas de POPC, o que indica que este complexo parece ser o mais solúvel em meio lipídico do que em MOPS.

Tabela 10 - Representação das espécies de vanádio (V) existentes em MOPS e em lipossomas de POPC.

 <p>$[\text{VO}_2(\text{dmpp})_2]^-$ -477 ppm</p>	 <p>$\text{VO}_2(\text{dmpp})$ -501 ppm</p>	 <p>$[\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ -556 ppm</p>
--	---	---

Após as 3 horas de aquisição, verificou-se ainda que a adição de ascorbato de sódio a esta mistura (figura 22), inverte o processo de oxidação, permitindo a redução das espécies de V(V) a V(IV), retomando-se o sinal inicial em RPE e desaparecendo os sinais em RMN.

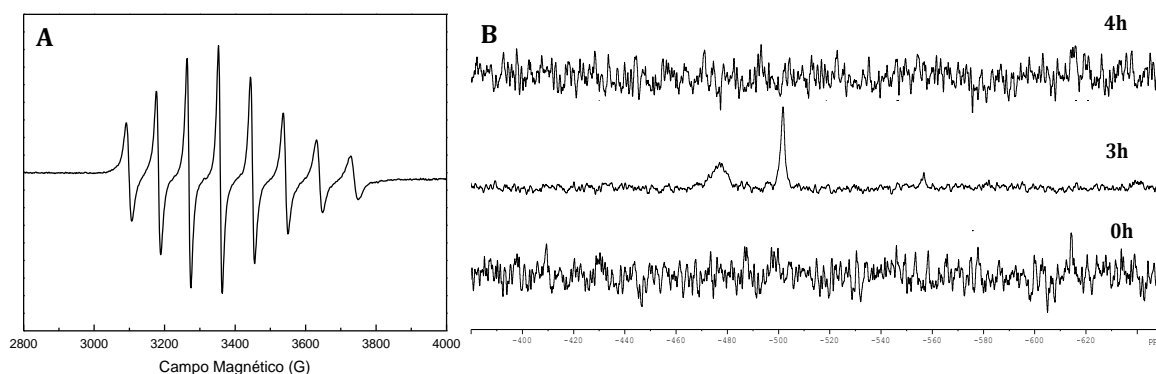


Figura 22 – Espectro de RPE do complexo de VO(dmpp)₂ em MOPS após a adição de ascorbato de sódio (A). Espectros de RMN de ⁵¹V do complexo de VO(dmpp)₂ em MOPS às 0h e às 3h, e às 4h após a adição de ascorbato de sódio (B).

No sentido de obter amostras com concentração rigorosa em espécie de vanádio fez-se um estudo em MOPS, com diferente concentração de complexo 1,5mM; 0,15mM e 0,015mM, não tendo sido possível, ainda assim, evitar a existência de algum complexo em suspensão. Apesar desta questão registaram-se os respetivos espectros de RPE afim de se ver o efeito da diminuição da espécie de vanádio presente (figura 23).

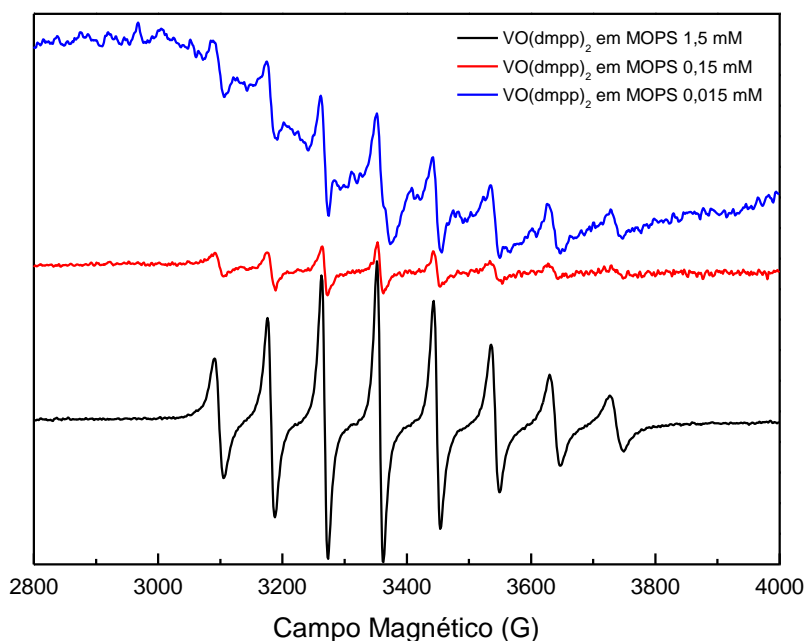


Figura 23 – Espectros de RPE de VO(dmpp)₂ em MOPS com diferentes concentrações (de baixo para cima, respetivamente 1,5mM; 0,15mM e 0,015mM).

Optou-se por fazer uma solução concentrada em DMSO com uma concentração igual a 6mM, sendo este o valor máximo conseguido. A partir desta solução concentrada e utilizando diferentes volumes da mesma prepararam-se soluções em que a concentração de complexo e percentagem de DMSO é mostrada na tabela 11.

Ainda que as soluções de complexos de vanádio com 5%, 10% e 15% de DMSO não possam ser utilizadas em estudos biológicos, foram utilizadas de modo a permitir a obtenção de informação relevante sobre o processo de oxidação e partição dos complexos.

Tabela 11 – Concentração de complexo e respetiva percentagem (V/V) de DMSO das soluções preparadas para os estudos realizados.

Concentração de VOL₂	% DMSO
0,06mM	1 %
0,6mM	5%
0,3mM	10 %
0,9mM	15 %

O DMSO foi o co-solvente escolhido, porque pode ser utilizado a nível biológico. Mais ainda, está descrito que este tem a capacidade de induzir a fusão e diferenciação celular e melhorar a permeabilidade das membranas lipídicas, aumentando a penetração tanto para fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos [94-96].

Este estudo mostra que, através da conjugação de espectroscopia de RPE e RMN, é possível seguir estes sistemas e a respetiva ocorrência de reações de oxidação/redução em solução e assim saber se os complexos formados correspondem a vanádio (IV) ou se este foi oxidado a vanádio (V).

5. Estudo de complexos de vanádio em MOPS por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente

Utilizando soluções preparadas como descrito na parte experimental (capítulo II) estudou-se o comportamento em solução para os quatro compostos, $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ ao longo do tempo (0h e 24h) e utilizando as espectroscopias de RPE e de RMN para os caracterizar.

Deste modo, obtiveram-se espectros de RPE à temperatura ambiente para as amostras com uma concentração de complexo 0,06mM (1% DMSO) (figura 24), onde se pode observar a diminuição da intensidade do sinal ao longo do tempo, provavelmente devido à ocorrência do processo de oxidação. Contudo verifica-se que a concentração da amostra é muito baixa e a quantidade de espécie em análise é muito diminuta, impossibilitando de seguir o processo em simultâneo por RPE e RMN.

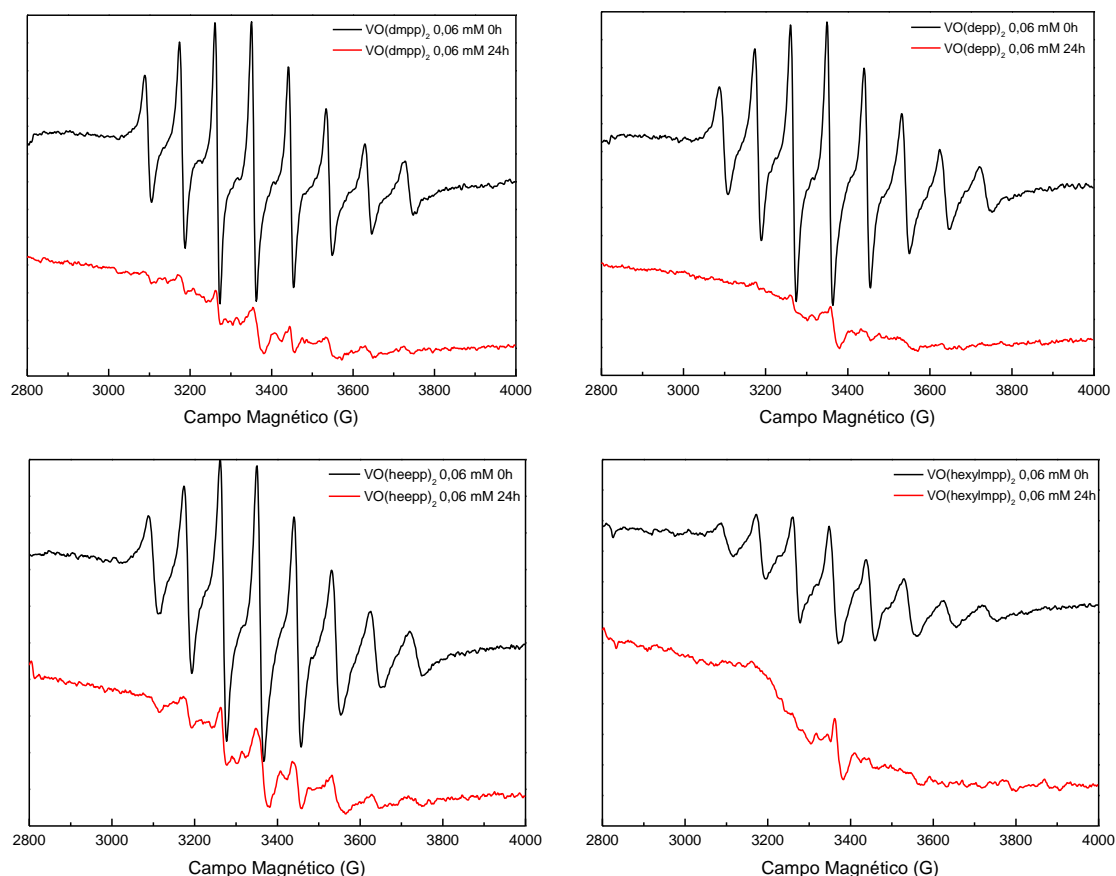


Figura 24 – Espectros de RPE dos complexos de vanádio em MOPS (0,06mM) à temperatura ambiente, às 0h e 24h.

Assim optou-se por aumentar da concentração de complexo e consequentemente a percentagem de DMSO, com o objetivo de melhorar as condições de aquisição e reprodutibilidade tanto para RPE como RMN. Estas condições permitiram nos espectros obtidos (figura 25) aumentar a intensidade de sinal e traduzem o aumento da percentagem de DMSO pelo aumento da largura da banda espectral.

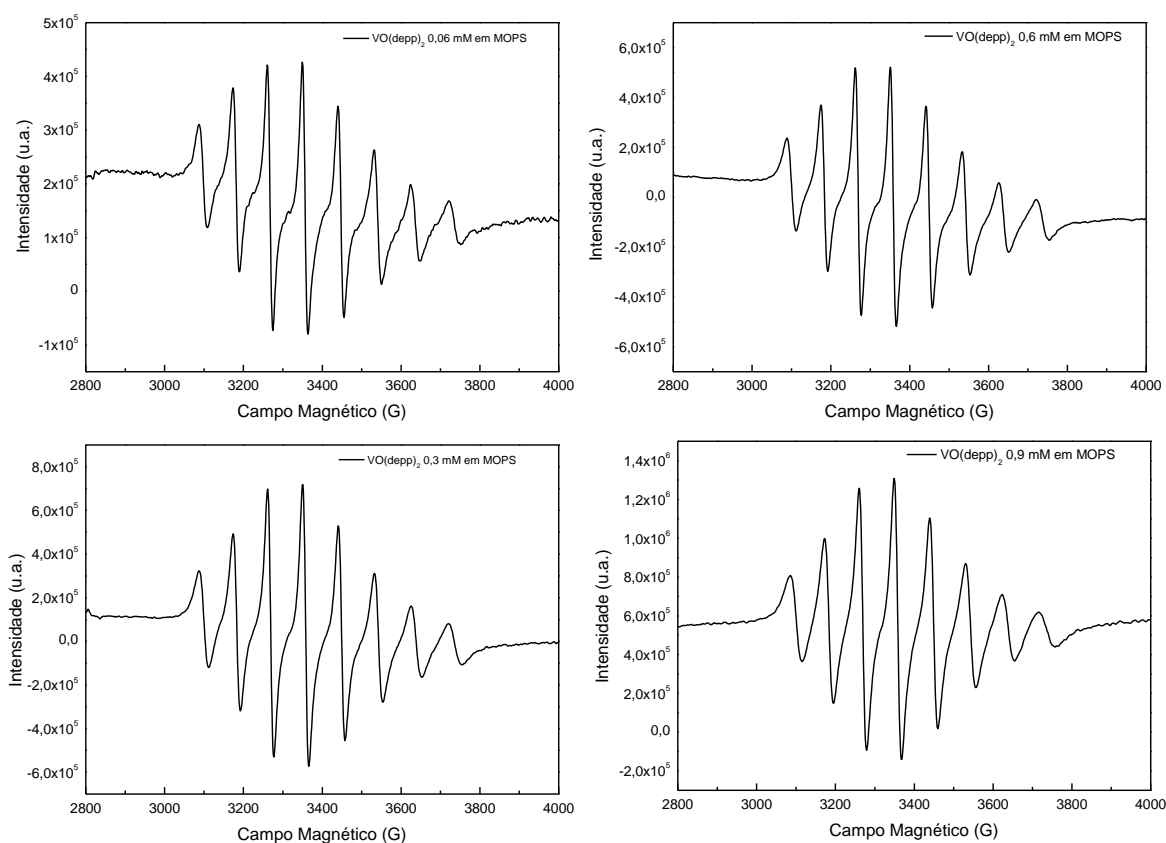


Figura 25 – Espectros de RPE do complexo VO(depp)₂ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h (os espectros dos restantes complexos encontram-se no anexo 3).

A análise dos espectros de RPE registados ao longo do tempo mostra que, no que respeita ao processo de oxidação, este é tanto mais lento quanto maior for a percentagem de DMSO. Este facto já se tinha verificado aquando do estudo da oxidação dos complexos de vanádio neste solvente.

Nos espectros correspondentes às 24 horas foi ainda possível verificar a existência de sinal em RPE, indicando a presença de vanádio (IV) em solução, comparativamente com o resultado obtido ao fim de 3 horas em MOPS, para o qual já não se obtinha sinal em RPE.

De modo a obter informação mais detalhada sobre o comportamento destes complexos em solução, obtiveram-se espectros de RPE (figura 26), em condições de matriz gelada, a 100 K.

Os espectros adquiridos são diferentes entre si, com intensidades diferentes, sendo mais intenso à medida que a concentração da solução aumenta, e consistentemente com a quantidade de espécie em solução. Verifica-se também que à medida que aumenta a concentração de composto e consequentemente a quantidade de DMSO os espectros apresentam melhor resolução, e espectros com 15% de DMSO possibilitam a realização de simulações computacionais devido à boa resolução apresentada. Esta melhor resolução é um efeito conjunto do aumento de quantidade de espécie paramagnética em solução e também da quantidade de DMSO que proporciona uma melhor matriz gelada.

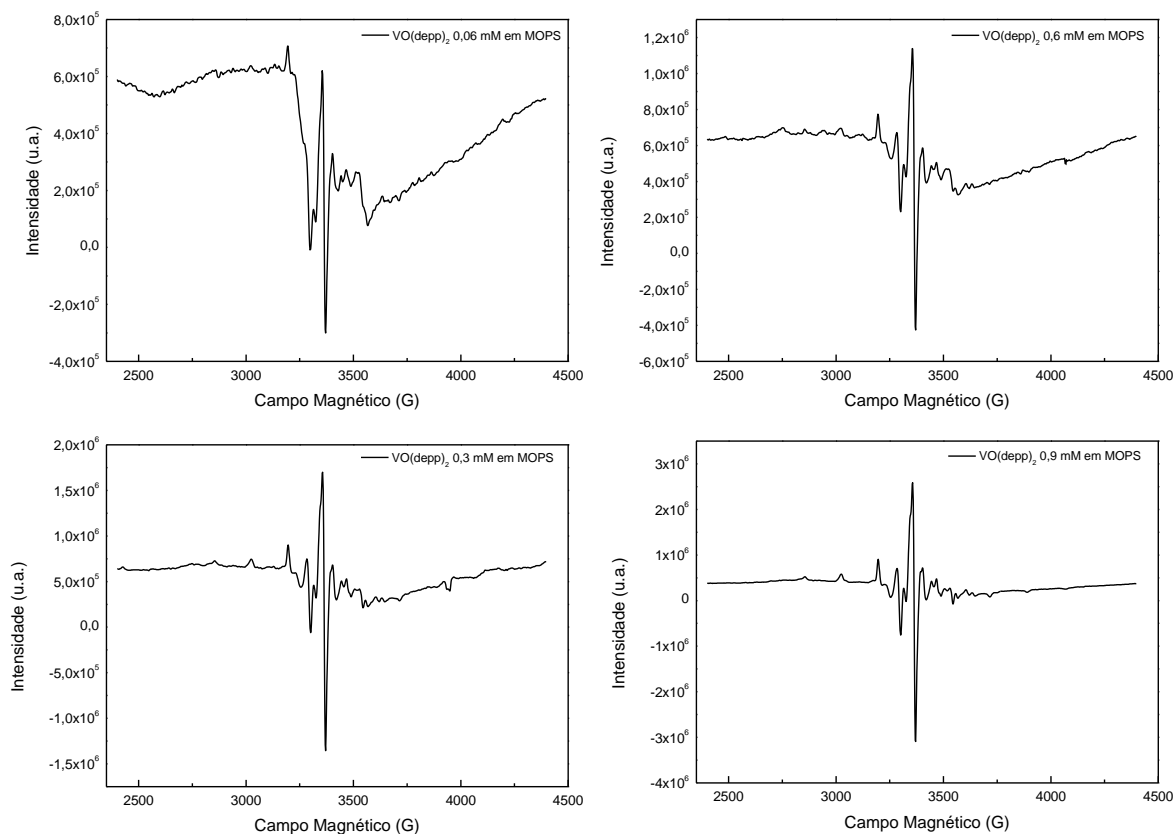


Figura 26 – Espectros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{depp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) a 100 K (os espectros dos restantes complexos encontram-se no anexo 4).

A fim de caracterizar as espécies de vanádio (V) provenientes da oxidação das espécies de VOL_2 presentes na solução com diferentes concentrações obtiveram-se espectros de RMN de ^{51}V ao longo do tempo (0h, 24h e 72h).

Na figura 27 está representado, para o complexo de $\text{VO}(\text{depp})_2$, os espectros obtidos às 0 horas para as diferentes concentrações (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM).

Os espectros com concentração de 0,06mM mostram dois sinais a -500 ppm e -556 ppm, que indicam a oxidação do complexo e presença de duas espécies. Este resultado é observado para todos os complexos (tabela 12) e de acordo com o estudado

anteriormente [26] estes sinais são atribuídos à espécie $\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O})_4$ a -556 ppm e a $\text{VO}_2(\text{L})$ a -500 ppm, como se pode observar na figura 27 para o complexo $\text{VO}(\text{depp})_2$.

A intensidade destes sinais é aumentada de acordo com o aumento da concentração do complexo.

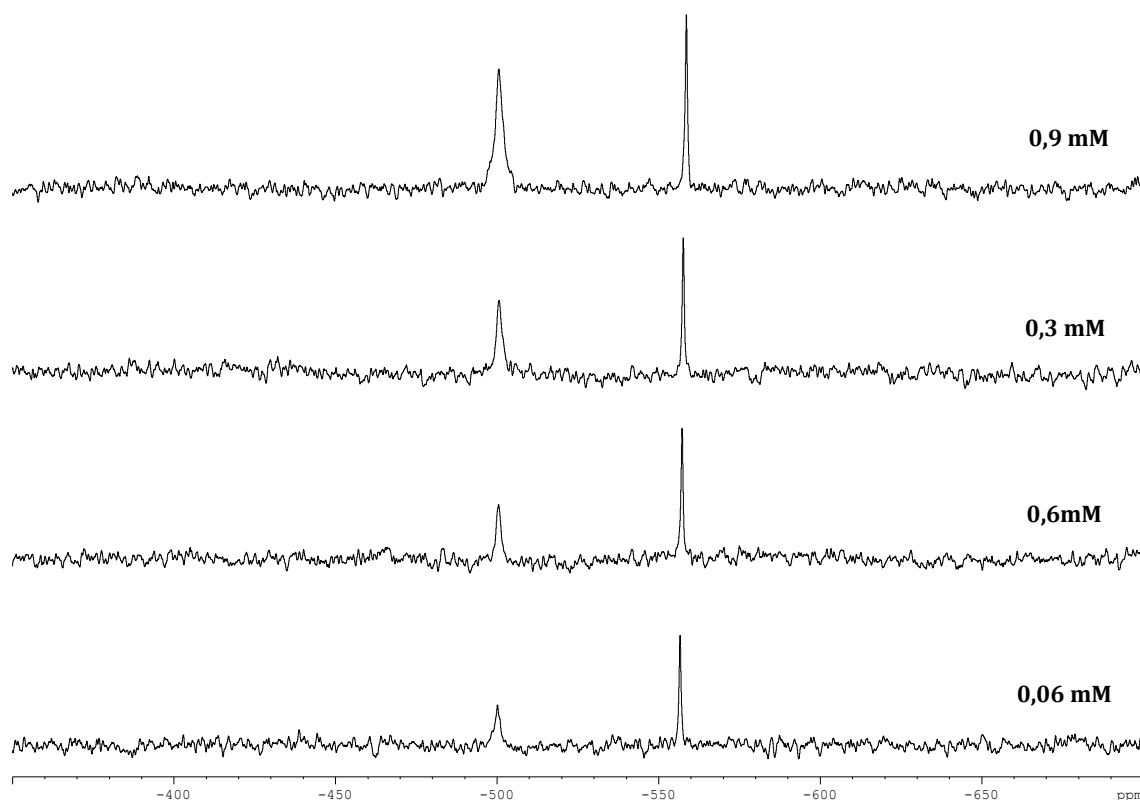


Figura 27 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{depp})_2$ em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0h (os espectros dos restantes complexos encontram-se no anexo 5).

O sinal da espécie $[\text{VO}_2\text{L}_2]^-$, para o complexo de $\text{VO}(\text{depp})_2$ começa a aparecer a -477 ppm, este sinal não é visível senão ao fim de 24 horas porque, se por um lado com 1% de DMSO a concentração é baixa (0,06mM), com uma concentração superior (0,9mM) a percentagem de DMSO aumenta e portanto a oxidação é retardada.

Este estudo permitiu a determinação dos desvios químicos para cada complexo em MOPS, e estes encontram-se descritos na tabela seguinte (tabela 12).

Tabela 12 – Desvios químicos (ppm) de ^{51}V nos espectros de RMN dos complexos de vanádio em MOPS.

	δ (ppm)							
	$\text{VO}(\text{dmpp})_2$		$\text{VO}(\text{depp})_2$		$\text{VO}(\text{hepp})_2$		$\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$	
0,06mM	—	-556,19	-500,07	-556,62	-501,27	-556,67	-502,00	-556,71
0,6mM	-501,40	-557,23	-500,42	-557,26	-500,68	-557,14	-501,59	-557,29
0,3mM	-501,40	-557,83	-500,56	-557,59	-500,68	-557,71	-501,94	-557,46
0,9mM	-501,40	-557,93	-500,49	-558,57	-500,68	-558,46	-501,66	-558,55

6. Estudo de complexos de vanádio em lipossomas de POPC por espectroscopia de RPE a temperatura ambiente e a 100K e por espectroscopia de RMN a temperatura ambiente

Para caracterizar as propriedades de partição dos complexos de vanádio: $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ com diferentes lipofilicidades, fez-se um estudo em que a preparação das amostras é idêntica à utilizada no ponto 5, sendo o solvente MOPS substituído por uma suspensão de lipossomas de POPC (8mM) para mimetizar as membranas biológicas.

Obtiveram-se espectros de RPE à temperatura ambiente (A_1 e A_2) e a 100 K (B_1 e B_2) para os complexos de vanádio com concentrações de complexo de 0,06mM e 0,9mM (1% e 15% respetivamente) (figuras 28, 29, 30 e 31). A concentração de 0,06mM com 1% de DMSO corresponde à concentração que é aceite para a utilização em meio celular e a concentração de 0,9mM com 15% de DMSO corresponde à concentração em que é possível avaliar as interações existentes na interface lípido/água.

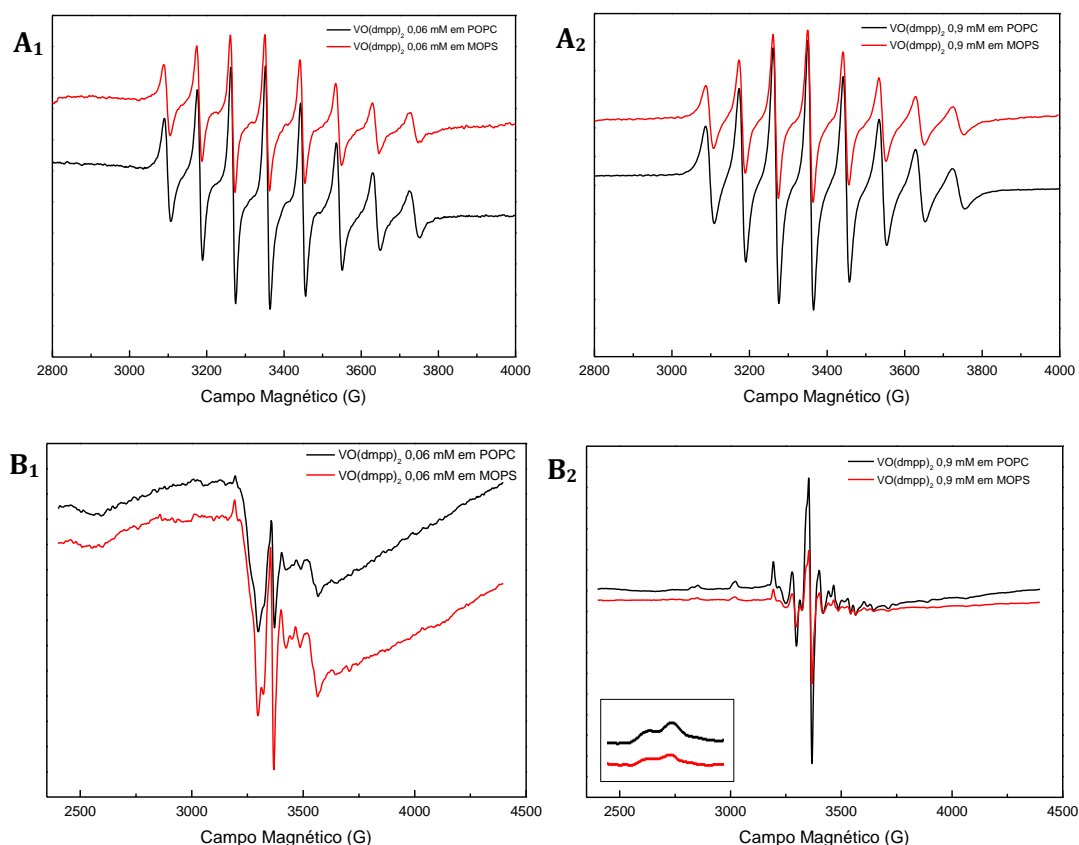


Figura 28 – Espectro de RPE do complexos de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ em MOPS (0,06mM e 0,9mM) (linha vermelha) e POPC (linha preta) à temperatura ambiente, às 0h (A_1 e A_2 - temperatura ambiente; B_1 e B_2 - 100 K).

Analisando os espectros obtidos para o complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ à temperatura ambiente observa-se um aumento da largura de banda, para os espectros referentes a 0,9mM, em relação aos espectros de 0,06mM, com 0,9mM temos mais quantidade de DMSO (15%) em solução. Este facto é idêntico ao observado para os estudos em MOPS.

Nos espectros à temperatura ambiente (A_1 e A_2) só é possível detetar um sinal em solução, contudo, a largura de banda pode não permitir a observação de mais espécies. De modo a obter informação mais detalhada e rigorosa sobre o comportamento deste complexo em solução, obtiveram-se espectros de RPE (figura 28) em condições de matriz gelada, a 100 K.

Os espectros obtidos sob estas condições 0,06mM (B_1) são muito semelhantes, e não têm resolução nem quantidade de espécie suficiente em análise para se retirar conclusões. Para os espectros a 0,9mM (B_2) verifica-se que estes são semelhantes, e em MOPS e em lipossomas de POPC. Em ambos os casos é possível distinguir na região de campo mais baixo (ver expansão, figura 28, B_2) dois sinais correspondentes a espécies de vanádio diferentes ou em diferentes vizinhanças.

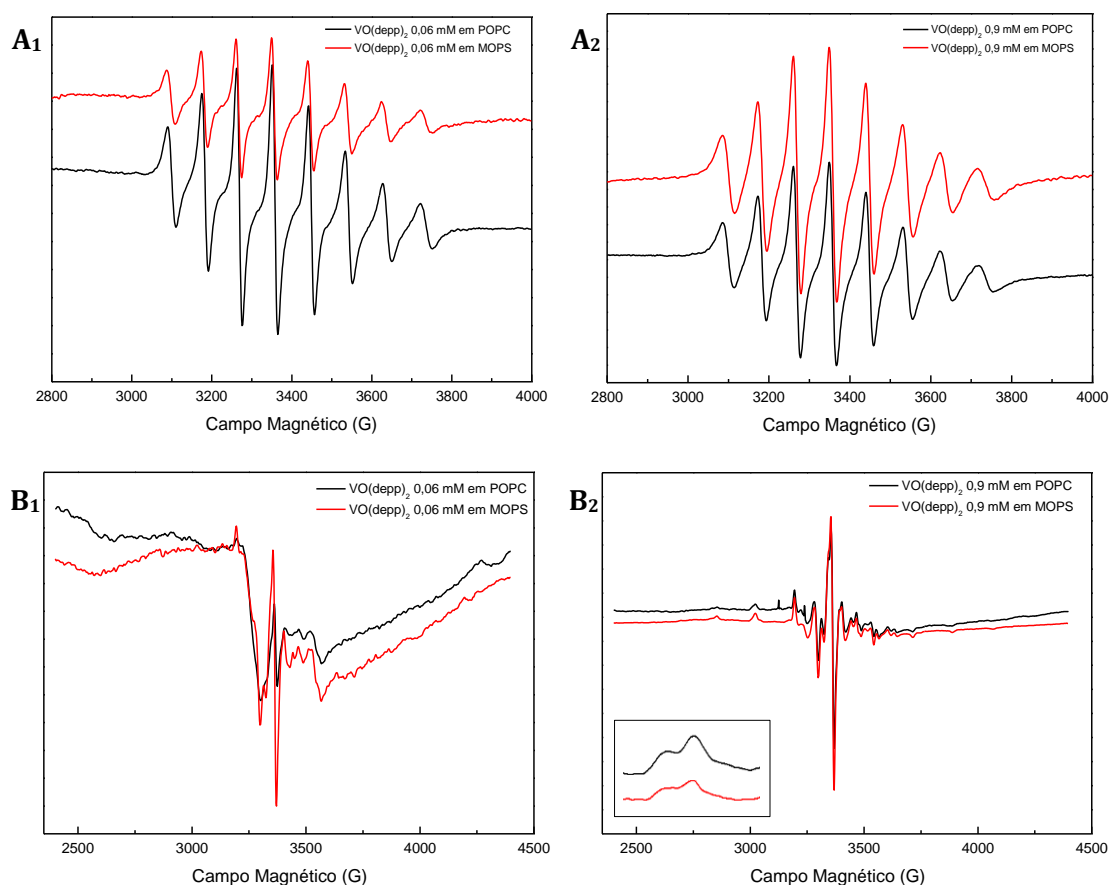


Figura 29 – Espectro de RPE do complexo de $\text{VO}(\text{depp})_2$ em MOPS (0,06mM e 0,9mM) (linha vermelha) e POPC (linha preta) à temperatura ambiente, às 0h (A_1 e A_2 - temperatura ambiente; B_1 e B_2 - 100 K).

No que concerne aos valores de g_{iso} e A_{iso} , após simulação verifica-se que os espectros correspondentes a 1% de DMSO apresentam parâmetros iguais aos de MOPS e de 15% de DMSO iguais aos obtidos em DMSO.

Para espectros com 1% de DMSO a 100 K não há resolução suficiente para extrair os valores de g (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) e A (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}). Para espectros com 15% de DMSO a 100 K, o sinal mais intenso é sobreponível com o sinal obtido em DMSO, não sendo no entanto possível obter o valor do outro sinal, que se atribui à espécie em MOPS.

Analisando os espectros obtidos para o complexo $VO(depp)_2$ (figura 29) tanto para temperatura ambiente como para 100 K, os resultados obtidos são os mesmos que para o complexo $VO(dmpp)_2$.

Ambos os complexos, $VO(dmpp)_2$ e $VO(depp)_2$, parecem interagir significativamente com a membrana, particionando-se na presença de lipossoma.

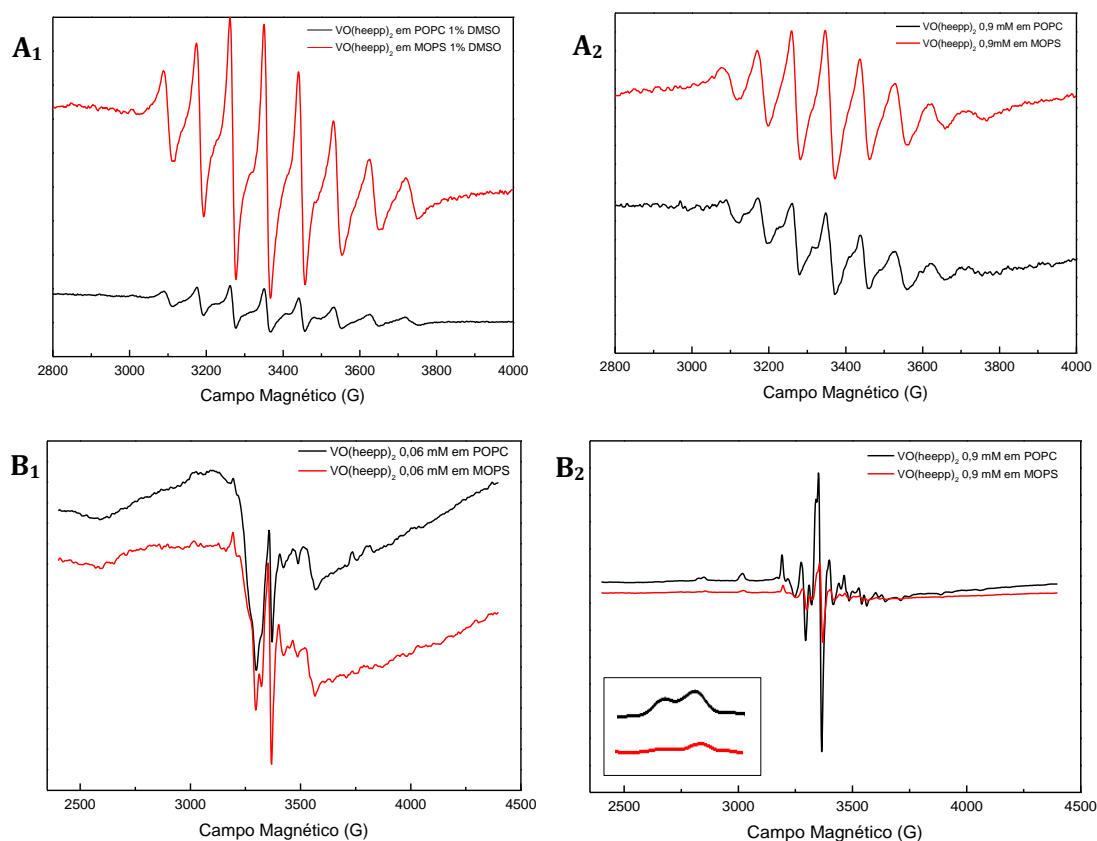


Figura 30 – Espectro de RPE do complexo de $VO(hepp)_2$ em MOPS (0,06mM e 0,9mM) (linha vermelha) e POPC (linha preta) à temperatura ambiente, às 0h (A_1 e A_2 - temperatura ambiente; B_1 e B_2 - 100 K).

No que respeita aos espectros obtidos para o complexo $VO(hepp)_2$ (figura 30, A_1 e A_2) à temperatura ambiente observa-se maior intensidade nos espectros em MOPS, em

comparação com os espectros em lipossomas de POPC, tanto a 0,06mM ou 0,9mM, o que seria de esperar pois este complexo é muito hidrofílico.

A análise destes espectros (A_1 e A_2) sugere a presença de uma só espécie em MOPS e de duas espécies em lipossomas de POPC. Contudo, à temperatura ambiente, a largura de banda é grande não permitindo confirmar este resultado. Assim para obter informação mais detalhada e rigorosa sobre o comportamento deste complexo em solução, obtiveram-se espectros de RPE (figura 30, B_1 e B_2) em condições de matriz gelada, a 100 K.

No que respeita aos espectros obtidos sob estas condições a 100 K com 0,06mM (B_1) são muito semelhantes, contudo não têm resolução nem quantidade de espécie suficiente em análise para se retirar conclusões. Contudo, os espectros obtidos com 0,9mM (B_2) confirmam a presença de duas espécies em lipossomas de POPC que se passam a distinguir claramente. A comparação de espectros em MOPS e lipossomas de POPC permite verificar que as duas espécies em lipossomas de POPC existem em quantidades próximas (expansão figura 30, B_2) enquanto que em MOPS uma das espécies é dominante sendo a outra perceptível por comparação com o espectro em lipossomas de POPC.

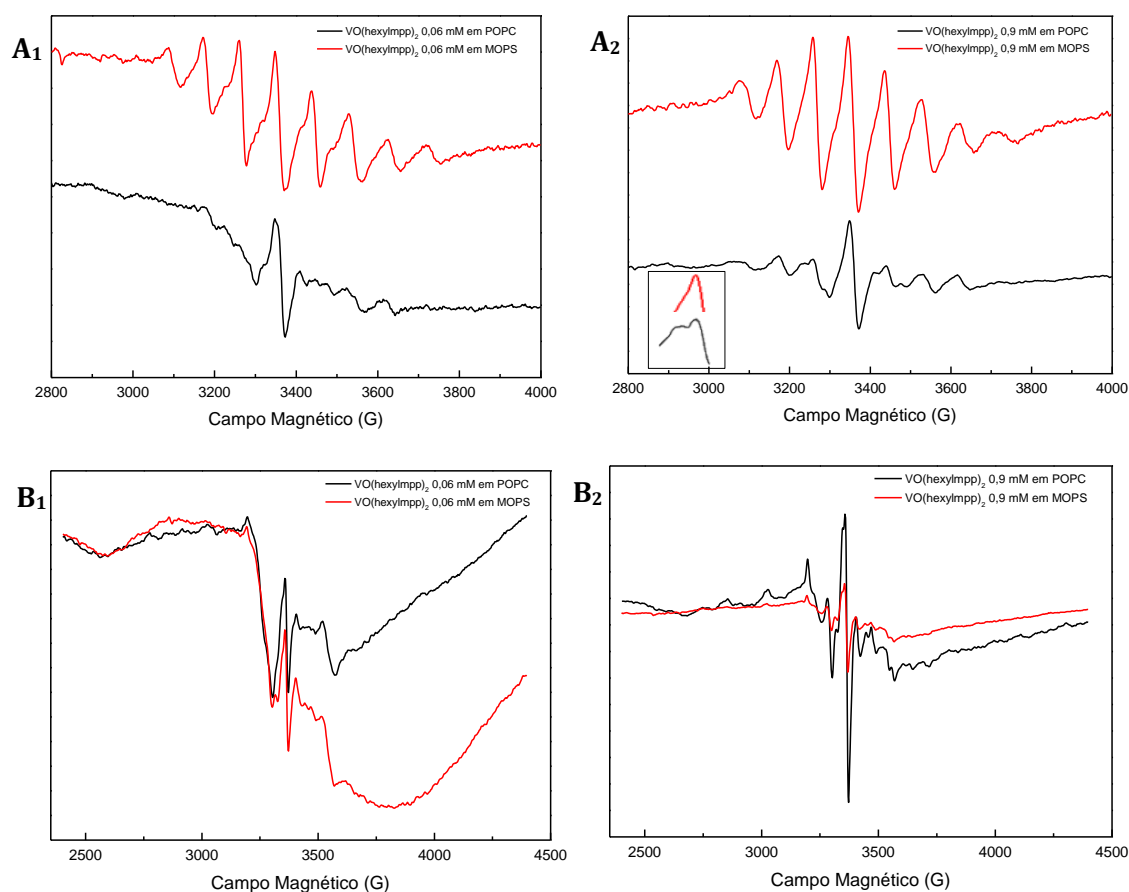


Figura 31 – Espectro de RPE do complexo de VO(hexylmpp)₂ em MOPS (0,06mM e 0,9mM) (linha vermelha) e POPC (linha preta), às 0h (A_1 e A_2 - temperatura ambiente; B_1 e B_2 - 100 K).

Quanto aos espectros obtidos para o complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ à temperatura ambiente (figura 31, A_1 e A_2) observa-se que os espectros a 0,06mM são muito diferentes, contudo não têm resolução nem quantidade de espécie suficiente em análise para se retirar conclusões. Para os espectros a 0,9mM, estes são também muito diferentes entre si. Nos espectros em lipossomas de POPC podem observar-se dois sinais, indicando que o complexo poderá estar em ambientes diferentes, originando duas espécies diferentes, enquanto nos espectros em MOPS é apenas possível observar uma espécie.

Assim, para obter informação mais detalhada e rigorosa sobre o comportamento deste complexo em solução, obtiveram-se espectros de RPE (figura 31, B_1 e B_2) em condições de matriz gelada, a 100 K. Mais uma vez, os espectros obtidos sob estas condições e a 0,06mM são muito semelhantes, contudo, estes espectros não têm resolução nem quantidade de espécie suficiente em análise para se retirar conclusões. Os espectros a 0,9mM são diferentes, tanto em MOPS como em lipossomas de POPC, sendo o sinal em lipossomas de POPC muito melhor resolvido indicando maior solubilidade nestes sistemas lipossômicos. Mais ainda, para o espectro em lipossomas de POPC é possível distinguir dois sinais na zona de campo mais alto não sendo no entanto possível simular computacionalmente o espectro.

Esta diferença de resultados é provavelmente devida ao fato do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ formar aglomerados em lipossomas de POPC (de acordo com dados não publicados de estudos realizados pelo grupo referentes a cálculos teóricos que indicam a formação de aglomerados deste complexo em solução na presença de lipossomas de DMPC), contudo o lípido permite uma melhor solubilização deste complexo, o que não se verifica em MOPS.

Os espectros correspondentes às 24 horas são muito semelhantes, o que indica, mais uma vez que a presença de DMSO é crucial no processo de oxidação, fazendo deste um processo bastante lento.

Estudos anteriores com o complexo $\text{VO}(\text{depp})_2$ em DMSO demonstram que este solvente tem a capacidade de coordenação a este complexo, com a formação de duas espécies: $[\text{VO}(\text{L})_2]$ que varia entre 85% e 90% e $[\text{VO}(\text{L})_2(\text{DMSO})]$ entre 10% a 20% [26]. Assim, foi feita a comparação entre os espectros obtidos com 15% DMSO em lipossomas de POPC e em DMSO puro (figura 32), de modo a aferir se as diferentes espécies obtidas são ambas correspondentes à presença de DMSO em solução.

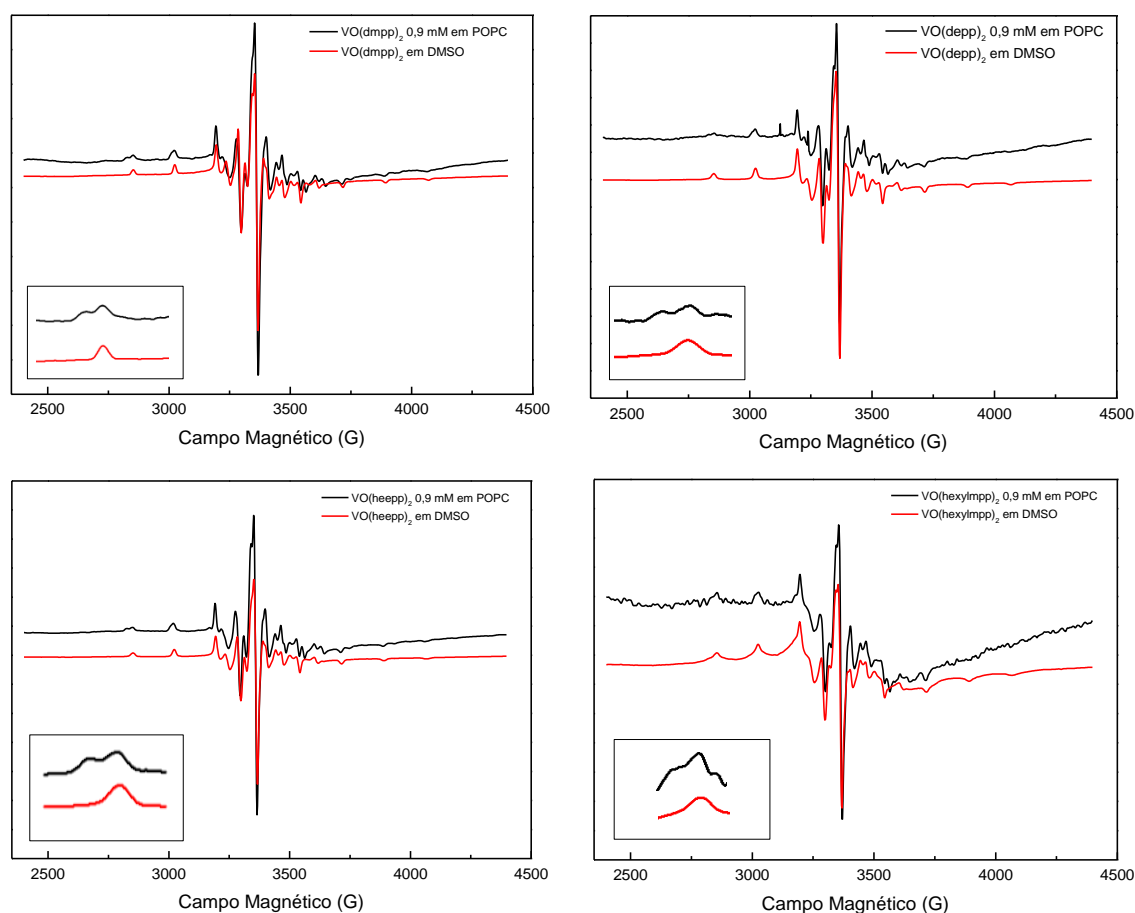


Figura 32 – Espectro de RPE dos complexos de vanádio a 100 K com 15% DMSO em lipossomas de POPC (linha preta) e em DMSO puro (linha vermelha).

Através da comparação destes espectros é possível observar que em DMSO apenas se observa uma espécie, enquanto que para os espectros em lipossoma é possível observar duas espécies, indicando que, a existência destas se deve à presença de lipossoma, caso contrário não seriam visíveis, pois o isômero $[\text{VO}(\text{L})_2(\text{DMSO})]$ só é possível ver com um aumento significativo, cerca de vinte vezes, do espectro obtido.

De modo a obter os valores de g (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) e A (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}) (tabela 13) para os vários complexos de vanádio a 0,9mM em lipossomas de POPC, foram realizadas simulações computacionais dos espectros adquiridos.

Tabela 13 – Parâmetros de Hamiltoniano de Spin para os complexos de vanádio (IV).

Solvente	Complexo	Valor de g			Valor de A (10^{-4} cm^{-1})		
		g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
Lipossomas POPC (0,9mM)	VO(dmpp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,2	160
		1,985	1,980	1,952	47	53,0	155
	VO(depp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,2	160
		1,985	1,980	1,952	47	53,0	155
	VO(hepp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,2	160
		1,985	1,980	1,952	47	53,0	155
	VO(hexylmpp) ₂	1,985	1,980	1,948	47	53,2	160
		1,985	1,980	1,952	47	53,0	155

Analisando os valores dos parâmetros de RPE obtidos por simulação dos espectros experimentais, tabela 13, verifica-se que os valores de g e A encontrados, para a espécie dominante (VOL₂), são idênticos aos valores obtidos com os espectros dos complexos de vanádio em DMSO (tabela 8), indicando a solvatação preferencial por este solvente.

A fim de caracterizar as espécies de vanádio (V) nas diferentes concentrações de composto (0,06mM e 0,9mM) e de percentagem de DMSO (1% e 15% respetivamente) em lipossomas de POPC, obtiveram-se espectros de RMN de ⁵¹V (figura 33 e 34) ao longo do tempo (0h, 24h e 72h).

Na figura 33 está representado, para o complexo de VO(dmpp)₂, os espectros obtidos às 0, 24 e 72 horas para a concentração de 0,06mM em MOPS e em lipossomas de POPC.

Estes espectros mostram que, a pH fisiológico, os complexos apresentam os mesmos sinais de ⁵¹V, exibindo assim, à medida que o tempo avança, dois sinais a -502 ppm e -557 ppm, indicando, que está a ocorrer a oxidação de V(IV) a V(V). À semelhança com os resultados anteriores, ocorre, para todos os complexos, a formação de duas espécies, VO₂(L) a -502 ppm e VO₂(H₂O)₄ a -557 ppm, como se pode observar na figura 33 para o complexo VO(dmpp)₂.

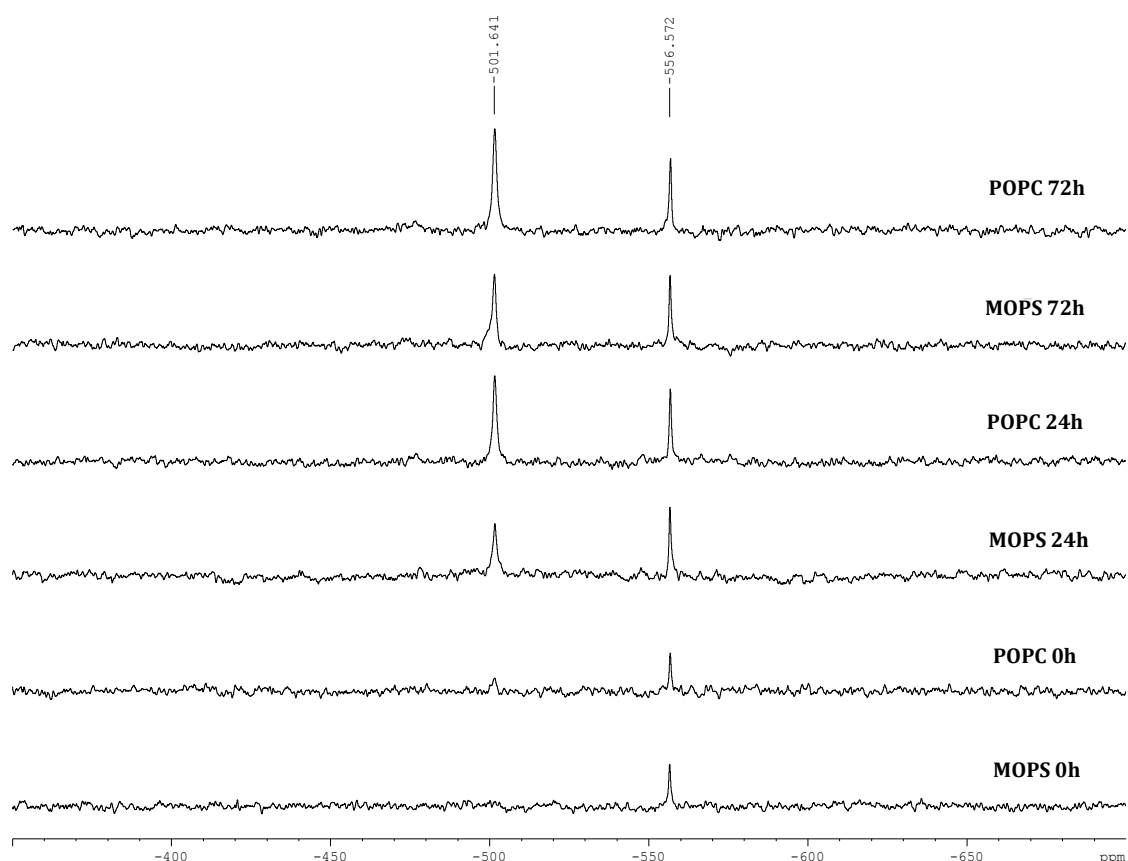


Figura 33 – Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ (0,06mM) em MOPS e em lipossomas de POPC à temperatura ambiente, às 0h, 24h e 72h (os espectros dos restantes complexos encontram-se no anexo 6).

Analisando os espectros de RMN para a concentração de 0,06mM (1% DMSO), verifica-se, para todos os complexos, quer em MOPS quer em lipossomas de POPC, os sinais de ^{51}V tornam-se mais intensos com o decorrer do tempo, pois a quantidade de espécie oxidada é maior. Os espectros obtidos com MOPS e em lipossomas de POPC são semelhantes, com intensidades ligeiramente diferentes. Na figura 34 está registado o espectro para o complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ na concentração de 0,9mM (15% DMSO). Nesta figura são evidentes as alterações observadas ao longo do tempo sendo possível a partir das 24 horas observar o sinal da espécie $[\text{VO}_2\text{L}_2]^-$ a -469 ppm. Estes sinais são idênticos em desvio químico e largura de banda aos observados para o complexo em estudo [26].

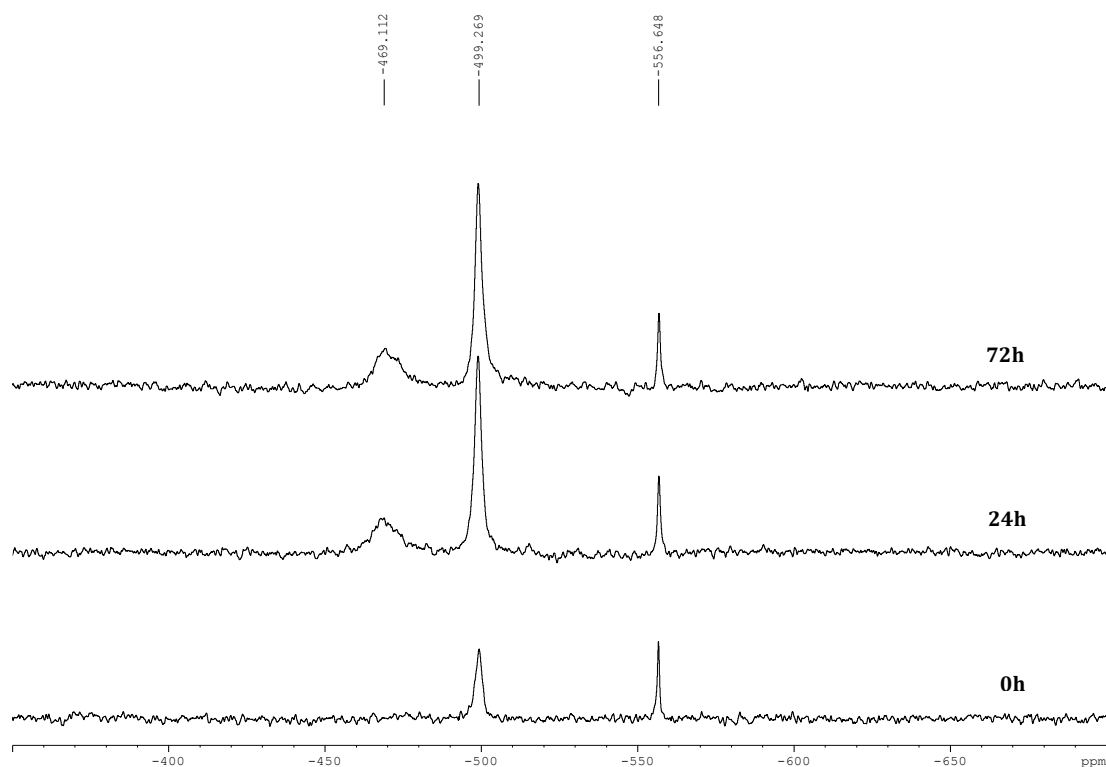


Figura 34 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ (0,9mM) em lipossomas de POPC às 0h, 24h e 72h a temperatura ambiente (os espectros dos restantes complexos encontram-se no anexo 7).

O sinal correspondente à espécie de $[\text{VO}_2(\text{L})_2]^-$, começa a ser visível às 24 horas em lipossomas de POPC, para os complexos $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ e $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e às 72 horas para os complexos $\text{VO}(\text{depp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$.

Este estudo permitiu a determinação dos desvios químicos para cada complexo em lipossomas de POPC, e estes encontram-se descritos na tabela seguinte (tabela 14).

Tabela 14 - Desvios químicos (ppm) de ^{51}V nos espectros de RMN dos complexos de vanádio em lipossomas de POPC.

	δ (ppm)		
$\text{VO}(\text{dmpp})_2$	-469,112	-499,269	-556,648
$\text{VO}(\text{depp})_2$	-462,367	-500,589	-558,544
$\text{VO}(\text{hepp})_2$	-466,702	-498,401	-556,719
$\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$	-466,360	-499,509	-556,548

Estes valores confirmam que as espécies para os diferentes ligandos são estruturalmente semelhantes havendo pequenas alterações no valor de desvio químico que não são superiores a 4 ppm.

7. Avaliação do efeito de diferentes quantidades de DMSO em lipossomas de POPC por DLS e por espectroscopia de RMN

Para avaliar o efeito da influência de DMSO em lipossomas de POPC, utilizou-se a técnica de DLS para determinar o tamanho e integridade dos lipossomas, e RMN de ^1H para avaliar a integridade dos lipossomas. Os resultados obtidos por DLS estão resumidos na tabela seguinte (tabela 15).

Tabela 15 – Média de tamanhos (diâmetro (nm)) da população de lipossomas de POPC obtido por DLS

	Diâmetro (nm):		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
POPC + 0% DMSO	106,6	109,1	108,6
POPC + 1% DMSO	—	136,6	136,8
POPC + 5% DMSO	133,8	150,0	153,1
POPC + 10% DMSO	163,1	179,2	178,9
POPC + 15% DMSO	185,3	204,3	202,4

Os valores obtidos demonstram a existência de uma só população com um aumento gradual do tamanho dos lipossomas à medida que aumenta a quantidade de DMSO, o que indica que o lipossoma não se desagrega, mantendo a sua integridade, e parece indicar que o DMSO adicionado tende a ficar associado ao lipossomas, tal como evidenciado pelo aumento do diâmetro da população medida.

Adicionalmente obtiveram-se os espectros de RMN de ^1H correspondentes em lipossomas com quantidades crescentes de DMSO (0%, 5%, 10% e 15%) (figura 35).

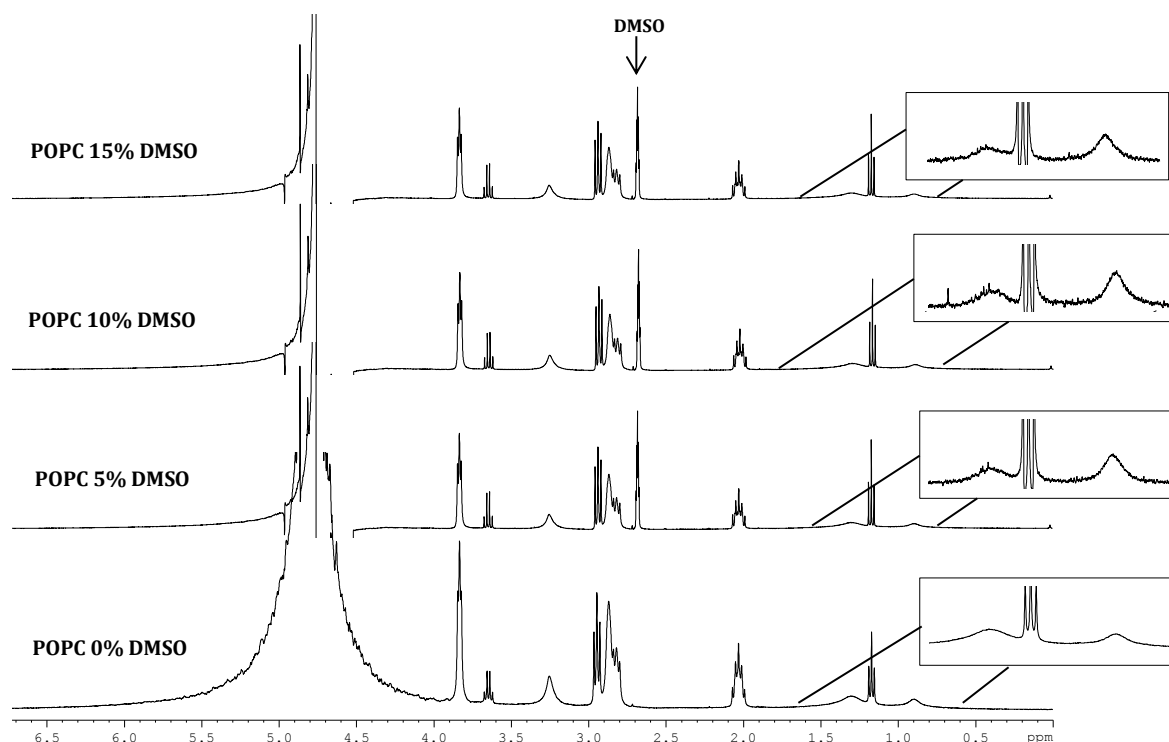


Figura 35 - Espetros de RMN de ^1H das misturas de lipossoma de POPC com 0%, 5%, 10% e 15% de DMSO, à temperatura ambiente (em expansão na zona de 0,6 a 1,7 ppm destacam-se os sinais correspondentes ao lipossoma).

Os espectros obtidos para as diferentes quantidades de DMSO são idênticos, demonstrando mais uma vez que a integridade do lipossoma face ao aumento da quantidade de DMSO não parece ser alterada [95-98]. Pela análise dos espectros é possível observar três picos característicos do lipossoma, que se mantêm com as diferentes quantidades de DMSO, indicando a presença do lipossoma intacto e não de sinais de cadeias de lípido isoladas.

Capítulo IV – Considerações Finais

Capítulo IV: Considerações Finais

O objetivo desta Dissertação incidiu no estudo de quatro complexos de oxidovanádio (IV) com ligandos da família das 3-hidroxi-4-piridinonas ($\text{VO}(\text{dmpp})_2$, $\text{VO}(\text{depp})_2$, $\text{VO}(\text{hepp})_2$ e $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$) com potencial efeito insulino-mimético. Foram realizados estudos de caracterização e oxidação na presença de oxigênio em vários solventes e estudos de localização em modelos membranares tendo sido utilizadas várias técnicas espectroscópicas (UV/VIS, RPE e RMN de ^{51}V e ^1H). A síntese destes complexos tinha já sido realizada no grupo de investigação onde se insere esta Dissertação.

A espectroscopia de UV/Vis foi utilizada para seguir a oxidação dos complexos na presença de oxigênio em vários solventes (DMSO, MOPS e H_2O). Os resultados obtidos coincidiram com os reportados na literatura para um dos compostos, $\text{VO}(\text{dmpp})_2$, e mostraram que a oxidação é retardada em DMSO. Os espectros obtidos são largos e não permitem uma distinção de diferentes espécies em solução.

Para caracterizar os complexos de oxidovanádio (IV) em diferentes solventes (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1), DMSO-tol (1:6)) e lipossomas de DMPC e de POPC, utilizou-se a espectroscopia de RPE. Os espectros obtidos em condições anaeróbicas apresentam um único sinal com o perfil esperado para este tipo de complexos, verificando-se que os parâmetros do Hamiltoniano de Spin não variam significativamente com o ligando confirmando assim que em solução se mantém a esfera e geometria de coordenação da espécie em fase sólida.

A caracterização estrutural e do processo de oxidação destes complexos com diferentes lipofilicidades, assim como as suas propriedades de partição são de extrema importância, pois permitem obter informação preciosa no que respeita à difusão e transporte destes complexos através de membranas biológicas. Para mimetizar estas últimas foram preparados lipossomas e caracterizados os complexos de vanádio em suspensão de lipossomas em tampão MOPS permitindo assim estimar a vizinhança preferencial do complexo.

Procedeu-se ao estudo em simultâneo de amostras dos complexos de vanádio por espectroscopia de RPE e RMN em MOPS e em lipossomas de POPC. Dada a baixa solubilidade dos complexos naqueles solventes e de forma a garantir uma concentração rigorosa, os complexos de vanádio foram dissolvidos em DMSO e depois adicionados a MOPS e lipossomas de POPC. Esta necessidade implica no entanto a presença do solvente DMSO no meio em estudo. Comparando os resultados em MOPS e lipossomas de POPC é notório que os espectros obtidos na presença de lipossomas são mais bem resolvidos sugerindo assim uma possível interação com aqueles agregados.

Os espectros dos complexos $\text{VO}(\text{dmpp})_2$ e $\text{VO}(\text{depp})_2$ em lipossomas de POPC (15% DMSO) exibem dois sinais, com intensidades semelhantes, que são consistentes com os sinais obtidos nos solventes puros DMSO e MOPS, indicando que estes compostos se distribuem em dois ambientes diferentes, originando duas espécies de vanádio (IV) diferentes, parecendo interagir significativamente com a membrana. Nos espectros obtidos em MOPS (15% DMSO) são também visíveis os dois sinais anteriormente referidos

embora o correspondente à fase aquosa seja muito menos intenso, o que mais uma vez sugere uma interação complexo/lipossoma.

No que respeita aos espectros obtidos para o complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$, em lipossomas de POPC (15% DMSO) podem observar-se dois sinais, indicando que o complexo sente dois ambientes diferentes. Os espectros obtidos em MOPS (15% DMSO) só exibem o sinal característico do composto em MOPS. A comparação dos dois resultados sugere que este complexo interage de forma significativa com o lipossoma.

Para o complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$ os espectros obtidos à temperatura ambiente mostram a existência de duas espécies em lipossomas de POPC (15% DMSO) enquanto que só é discernível um sinal em MOPS (15% DMSO). A baixa temperatura o sinal em MOPS (15% DMSO) é muito fraco dada a tendência deste complexo para formar aglomerados em fase aquosa. O espectro em lipossomas de POPC (15% DMSO) é melhor resolvido e sugere a presença de duas espécies.

Relativamente ao processo de oxidação na presença de ar este foi seguido por RMN de ^{51}V sendo possível para o conjunto dos quatro complexos de vanádio, tanto em MOPS como em lipossomas de POPC, observar três sinais correspondentes às espécies de vanádio (V): $[\text{VO}_2(\text{L})_2]^-$, $\text{VO}_2(\text{L})$ e $[\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ caracterizando assim os respetivos produtos de oxidação. Mais ainda, a adição de ascorbato de sódio inverte o processo de oxidação, permitindo a redução das espécies de vanádio (V) a vanádio (IV), retomando-se o sinal inicial em RPE e desaparecendo os sinais em RMN.

A conjugação das diferentes técnicas espectroscópicas revelou ser muito útil no estudo da oxidação e propriedades de partição dos complexos de vanádio com os ligandos 3,4-HPO.

Perspetivas Futuras

O vanádio é um dos metais mais estudados com maior potencial insulino-mimético. Contudo o seu uso na clínica ainda tem grandes obstáculos devido à sua baixa solubilidade em água.

São também necessários mais estudos de partição e permeação destes compostos, com lipossomas constituídos por diferentes lípidos, de modo a aferir sobre a sua localização em membranas biológicas.

A utilização de lipossomas como veículo de transporte para estes compostos é uma possibilidade, uma vez que estes já são utilizados na administração de fármacos pela indústria farmacêutica e permitem uma terapia direcionada, com a utilização de doses de fármaco reduzidas. Contudo são necessários mais estudos de modo averiguar quais os que permitem uma boa solubilidade destes compostos, para uma administração segura e eficaz sugerindo-se a possibilidade de utilizar outro tipo de nanopartículas lipídicas.

Estudos de bioreatividade também são necessários, de modo a averiguar qual o comportamento destes complexos em meio biológico.

Capítulo V – Referências Bibliográficas

Capítulo V: Referências Bibliográficas

1. Sakurai, H., et al., *Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes*. Coordination Chemistry Reviews, 2002, **226**, 187-198.
2. Levina, A. and P.A. Lay, *Metal-based anti-diabetic drugs: Advances and challenges*. Dalton Transactions, 2011, **40**, 11675-11686.
3. Maanvizhi, S., et al., *Metal complexes in the management of diabetes mellitus: A new therapeutic strategy*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, **6**, 40-44.
4. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2010, **87**, 4-14.
5. Guariguata, L., et al., *Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2014, **103**, 137-149.
6. Rangel, M., *Pyridinone oxovanadium(IV) complexes: a new class of insulin mimetic compounds*. Transition Metal Chemistry, 2001, **26**, 219-223.
7. (WHO), W.H.O. *Diabetes*. 2015 [acedido em 2015 Maio, 28]; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
8. Rangel, M., et al., *Novel 3-hydroxy-4-pyridinonato oxidovanadium(IV) complexes to investigate structure/activity relationships*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2009, **103**, 496-502.
9. Imam, S.K., *Chapter 3 - Diabetes: A New Horizon and Approach to Management*, in *Glucose Intake and Utilization in Pre-Diabetes and Diabetes*, R.R.W.B. Dokken, Editor. 2015, Academic Press: Boston. p. 29-44.
10. (WHO), W.H.O. *About diabetes*. 2015 [acedido em 2015 Maio, 28]; Disponível em: http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/.
11. Sonia, T.A. and C.P. Sharma, *Diabetes mellitus – an overview*, in *Oral Delivery of Insulin*, T.A. Sonia and C.P. Sharma, Editors. 2014, Woodhead Publishing. p. 1-57.
12. Hiromura, M., et al., *Glucose lowering activity by oral administration of bis(allixinato)oxidovanadium(iv) complex in streptozotocin-induced diabetic mice and gene expression profiling in their skeletal muscles*. Metallomics, 2009, **1**, 92-100.
13. Moniz, T., *Design de Fármacos de Administração Oral para a Terapia da Diabetes mellitus: Síntese de Ligandos Fluorescentes do Tipo 3- hidroxi-4-piridinonas, Complexos de Zn(II) e VO(II) e Avaliação da Respectiva Actividade Insulino-mimética*. Dissertação de Licenciatura em Bioquímica submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2009.

14. Rehder, D., et al., *The medicinal and catalytic potential of model complexes of vanadate-dependent haloperoxidases*. Coordination Chemistry Reviews, 2003, **237**, 53-63.
15. Virally, M., et al., *Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives*. Diabetes and Metabolism, 2007, **33**, 231-244.
16. Moniz, T., et al., *Investigation of the insulin-like properties of zinc(II) complexes of 3-hydroxy-4-pyridinones: identification of a compound with glucose lowering effect in STZ-induced type I diabetic animals*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2011, **105**, 1675-1682.
17. WebMD. *Inhaled Insulin*. 2015 [acedido em 2015 Maio, 29]; Disponível em: <http://www.webmd.com/diabetes/guide/inhaled-insulin>.
18. Sakurai, H., et al., *Metallo-allixinate complexes with anti-diabetic and anti-metabolic syndrome activities*. Metallomics, 2010, **2**, 670-682.
19. Guerrero-Romero, F. and M. Rodriguez-Moran, *Complementary therapies for diabetes: the case for chromium, magnesium, and antioxidants*. Archives of Medical Research, 2005, **36**, 250-257.
20. Balk, E.M., et al., *Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids: a systematic review of randomized controlled trials*. Diabetes Care, 2007, **30**, 2154-2163.
21. Sakurai, H., A. Katoh, and Y. Yoshikawa, *Chemistry and biochemistry of insulin-mimetic vanadium and zinc complexes. Trial for treatment of diabetes mellitus*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2006, **79**, 1645-1664.
22. Yoshikawa, Y. and H. Yasui, *Zinc complexes developed as metallopharmaceutics for treating diabetes mellitus based on the bio-medicinal inorganic chemistry*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012, **12**, 210-218.
23. Sakurai, H. and Y. Adachi, *The Pharmacology of the Insulinomimetic Effect of Zinc Complexes*. Biometals, 2005, **18**, 319-323.
24. Crichton, R.R., -17- - *Molybdenum, Tungsten, Vanadium and Chromium*, in *Biological Inorganic Chemistry*, R.R. Crichton, Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 279-296.
25. Villas-Boas, L.F., et al., *Comprehensive Coordination Chemistry*. Pergamon press. 1987, Oxford: Pergamon press.
26. Rangel, M., et al., *Spectroscopic and potentiometric characterization of oxovanadium(IV) complexes formed by 3-hydroxy-4-pyridinones. Rationalization of the influence of basicity and electronic structure of the ligand on the properties of V IVO species in aqueous solution*. Inorganic Chemistry, 2006, **45**, 8086-8097.
27. Castro, M.C.A., *Estudos da Química Bioinorgânica do Vanádio (V) por Ressonância Magnética Nuclear*. Dissertação para Doutorado em Química submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Faculdade de Coimbra, Coimbra, 1991.

28. Castro, M.M.C.A., et al., *Study of the oxidation products of the VO(dmpp)₂ complex in aqueous solution under aerobic conditions: comparison with the vanadate-dmpp system*. Inorganica Chimica Acta, 2003, **356**, 142-154.
29. Santos, M.A., *Recent developments on 3-hydroxy-4-pyridinones with respect to their clinical applications: Mono and combined ligand approaches*. Coordination Chemistry Reviews, 2008, **252**, 1213-1224.
30. Burgess, J. and M. Rangel, *Hydroxypyranones, hydroxypyridinones, and their complexes*, in *Advances in Inorganic Chemistry*, E. Rudi van, Editor. 2008, Academic Press. p. 167-243.
31. Rangel, M., et al., *Distinctive EPR signals provide an understanding of the affinity of bis-(3-hydroxy-4-pyridinonato) copper(II) complexes for hydrophobic environments*. Dalton Transactions, 2014, **43**, 9722-9731.
32. Castro, M.M.C.A., et al., *Structural study of the interaction of vanadate with the ligand 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone (Hdmpp) in aqueous solution*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2000, **80**, 177-179.
33. Burgess, J., et al., *Synthesis and characterization of 3-hydroxy-4pyridinone-oxovanadium(IV) complexes*. Polyhedron, 1997, **16**, 789-794.
34. Rangel, M., et al., *In vitro study of the insulin-like action of vanadyl-pyrone and -pyridinone complexes with a VO(O4) coordination mode*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2001, **6**, 128-132.
35. Crisponi, G. and M. Remelli, *Iron chelating agents for the treatment of iron overload*. Coordination Chemistry Reviews, 2008, **252**, 1225-1240.
36. Liu, Z.D. and R.C. Hider, *Design of iron chelators with therapeutic application*. Coordination Chemistry Reviews, 2002, **232**, 151-171.
37. Lyonnet, M. and E. Martin, *L'emploi thérapeutique des dérivés du vanadium*. La Presse Medicale 1899, **7**, 191-192.
38. Sakurai, H., et al., *Orally active and long-term acting insulin-mimetic vanadyl complex:bis(picolinato)oxovanadium (IV)*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, **214**, 1095-1101.
39. Thompson, K.H., et al., *Comparison of anti-hyperglycemic effect amongst vanadium, molybdenum and other metal maltol complexes*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2004, **98**, 683-690.
40. Sakurai, H., *A new concept: the use of vanadium complexes in the treatment of diabetes mellitus*. Chemical Record, 2002, **2**, 237-248.
41. Sakurai, H., et al., *Role of vanadium in treating diabetes*. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine, 1999, **12**, 393-401.

42. SK, B. and S. SK, *Metal Based Drugs: Current Use and Future Potential*. Der Pharmacia Lettre 2009, **1** 39-51.
43. Sakurai, H., *Overview and Frontier for the Development of Metallopharmaceutics*. Eisei kagaku, 2010, **56**, 129-143.
44. Thompson, K.H. and C. Orvig, *Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design*. Dalton Transactions, 2006 761-764.
45. Wiernsperger, N. and J. Rapin, *Trace elements in glucometabolic disorders: an update*. Diabetology & Metabolic Syndrome 2010, **2**, 70-90.
46. Chris Jones and John Thornback, *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*, in *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*. 2007, The Royal Society of Chemistry. p. 201-323.
47. Thompson, K.H. and C. Orvig, *Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, **100**, 1925-1935.
48. Rehder, D., et al., *In vitro study of the insulin-mimetic behaviour of vanadium(IV, V) coordination compounds*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2002, **7**, 384-396.
49. Gonçalves, M.d.C.S.S.R., *Aplicação da Espectroscopia de Ressonância de Spin Electrónica ao estudo dos produtos da fotólise de compostos modelo da vitamina B12*. Dissertação para Douturamento em Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Porto, 1988.
50. Melis, C., S. Ali Demir, and B. Seyda, *Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery*. Application of Nanotechnology in Drug Delivery. 2014.
51. Kalepu, S., et al., *Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review*. International Journal of Drug Development and Research, 2013, **5**, 62-75.
52. Mallick, S. and J.S. Choi, *Liposomes: Versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014, **14**, 755-765.
53. Van Der Meel, R., et al., *Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field*. Journal of Controlled Release, 2014, **195**, 72-85.
54. Rossi-Bergmann, B., *A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico*. Ciência e Cultura, 2008, **60**, 54-57.
55. Moghimipour, E. and S. Handali, *Liposomes as drug delivery systems: Properties and applications*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2013, **4**, 169-185.
56. Zhang, J.X., et al., *Application of liposomes in drug development - focus on gastroenterological targets*. International Journal of Nanomedicine, 2013, **8**, 1325-1334.

57. Ebrahim, S., G.A. Peyman, and P.J. Lee, *Applications of Liposomes in Ophthalmology*. Survey of Ophthalmology, 2005, **50**, 167-182.
 58. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews 2013, **65**, 36-48.
 59. Drulis-Kawa, Z. and A. Dorotkiewicz-Jach, *Liposomes as delivery systems for antibiotics*. International Journal of Pharmaceutics, 2010, **387**, 187-198.
 60. Barzanti, C., et al., *Potentiometric determination of octanol-water and liposome-water partition coefficients of ionizable organic compounds*. Tetrahedron Letters, 2007, **48**, 3337-3341.
 61. Ferreira, S.I., *Utilização de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica para avaliar as propriedades de distribuição de compostos de relevância biológica em lipossomas de DMPC e DMPG*. Dissertação de Licenciatura em Bioengenharia submetida à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2013.
 62. Dhandapani, N.V., et al., *Liposomes as novel drug delivery system: A comprehensive review*. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, 2013, **4**, 187-193.
 63. Arias, J.L., *Liposomes in drug delivery: A patent review (2007 - present)*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2013, **23**, 1399-1414.
 64. Sousa, I.C.C., *Interação da Enrofloxacin com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas*. Dissertação de Mestrado em ecnologia, Ciência e Segurança Alimentar submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2007.
 65. Jesorka, A. and O. Orwar, *Liposomes: technologies and analytical applications*. Annual Review of Analytical Chemistry, 2008, **1**, 801-832.
 66. Akbarzadeh, A., et al., *Liposome: Classification, preparation, and applications*. Nanoscale Research Letters, 2013, **8**, 1-8.
 67. Avanti. Polar Lipids, I. *Natural Lipids*. 2015 [acedido em 2015 Junho, 4]; Disponível em: <http://www.avantilipids.com/>.
 68. Lasic, D., *Applications of liposomes*. Handbook of biological physics, 1995, **1**, 491-519.
 69. Zawada, Z., *A single-step method of liposome preparation*. Cellular and Molecular Biology Letters, 2004, **9**, 603-615.
 70. Avanti. Polar Lipids, I. *16:0-18:1 PC 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*
- 2015 [acedido em 2015 Junho, 5]; Disponível em: http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=243&Itemid=208&catnumber=850457.

71. Lasic, D.D., *Novel applications of liposomes*. Trends in Biotechnology, 1998, **16**, 307-321.
72. Zawada, Z.H., *A single-step method of liposome preparation*. Cellular and Molecular Biology Letters, 2004, **9**, 603-612.
73. Arouri, A., et al., *Lipases, liposomes and lipid-prodrugs*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2013, **18**, 419-431.
74. Elizondo, E., et al., *Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine*, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, V. Antonio, Editor. 2011, Academic Press. p. 1-52.
75. Hatziantoniou, S. and C. Demetzos, *Lipids of membranes: Chemistry, biological role and applications as drug carriers*, in *Studies in Natural Products Chemistry*, R. Attaur, Editor. 2008, Elsevier. p. 173-202.
76. Andresen, T.L., S.S. Jensen, and K. Jørgensen, *Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release*. Progress in Lipid Research, 2005, **44**, 68-97.
77. Eggen, S., et al., *Ultrasound improves the uptake and distribution of liposomal Doxorubicin in prostate cancer xenografts*. Ultrasound in Medicine and Biology, 2013, **39**, 1255-1266.
78. Zhang, J.X., et al., *Application of liposomes in drug development--focus on gastroenterological targets*. International Journal of Nanomedicine, 2013, **8**, 1325-1334.
79. Evjen, T.J., et al., *Physicochemical characterization of liposomes after ultrasound exposure - mechanisms of drug release*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, **78-79**, 118-122.
80. Beck-Broichsitter, M., et al., *Correlation of drug release with pulmonary drug absorption profiles for nebulizable liposomal formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013, **84**, 106-114.
81. Dima, V.F., et al., *Immune response to Escherichia coli antigens entrapped in liposomes. I. Immunopathological studies*. Roumanian archives of microbiology and immunology, 1999, **58**, 223-239.
82. Hugo, A.A., et al., *Effect of human defensins on lactobacilli and liposomes*. Journal of Applied Microbiology, 2012, **113**, 1491-1497.
83. Rosada, R.S., et al., *Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes*. BMC Immunology, 2008, **9**, 38.

84. Ingram, T., et al., *Prediction of micelle/water and liposome/water partition coefficients based on molecular dynamics simulations, COSMO-RS, and COSMOmic*. Langmuir, 2013, **29**, 3527-3537.
85. Jo, S.M., et al., *Rapid detection of exon 2-deleted AIMP2 mutation as a potential biomarker for lung cancer by molecular beacons*. Biosensors and Bioelectronics, 2013, **46**, 142-149.
86. Sułkowski, W.W., et al., *Application of spin labels for research of vanadyl acetylacetonate concentration in model bilayer membranes by EPR spectroscopy*. Molecular Crystals and Liquid Crystals, 2012, **554**, 195-208.
87. Faneca, H., et al., *Vanadium compounds as therapeutic agents: some chemical and biochemical studies*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2009, **103**, 601-608.
88. Nejo, A.A., et al., *Synthesis, structural, and insulin-enhancing studies of oxovanadium(iv) complexes*. Australian Journal of Chemistry, 2011, **64**, 1574-1579.
89. Perkampus, H.-H., *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Springer laboratory. 1992, Berlin ; New York: Springer-Verlag. 244-320.
90. Howarth, O.W., *Vanadium-51 NMR*. 1991: Pergamon Press.
91. Nunes, C.D., et al., *Vanadyl cationic complexes as catalysts in olefin oxidation*. Dalton Transactions, 2015, **44**, 5125-5138.
92. Crichton, R.R., -6- - *Methods to Study Metals in Biological Systems*, in *Biological Inorganic Chemistry*, R.R. Crichton, Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 105-116.
93. Bangham, A.D., M.M. Standish, and G. Weissmann, *The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations*. Journal of Molecular Biology, 1965, **13**, 253-328.
94. Notman, R. and J. Anwar, *Breaching the skin barrier--insights from molecular simulation of model membranes*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, **65**, 237-250.
95. de Menorval, M.A., et al., *Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells*. PLoS One, 2012, **7**, 41733-41745.
96. Gurtovenko, A.A. and J. Anwar, *Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide*. The Journal of Physical Chemistry B, 2007, **111**, 10453-10460.
97. Kennedy, A., et al., *The interaction of DMSO with model membranes. II. Direct evidence of DMSO binding to membranes: an NMR study*. Journal of Liposome Research, 2003, **13**, 259-267.
98. Notman, R., et al., *Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes*. Journal of the American Chemical Society, 2006, **128**, 13982-13983.

Capítulo VI – Anexos

Capítulo VI: Anexos

Anexo 1

Espetros de RPE dos complexos de vanádio nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)), à temperatura ambiente.

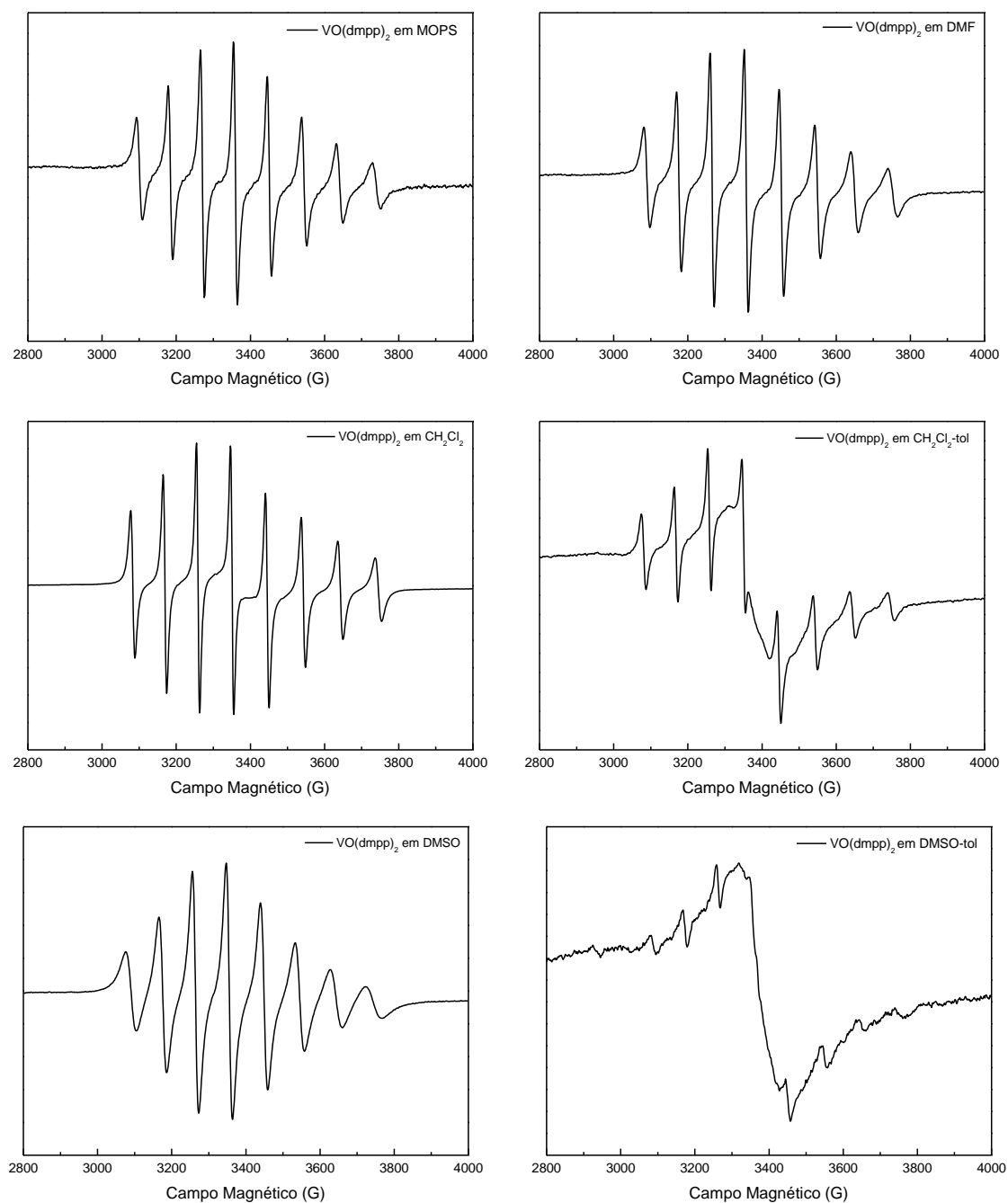


Figura 36 – Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$.

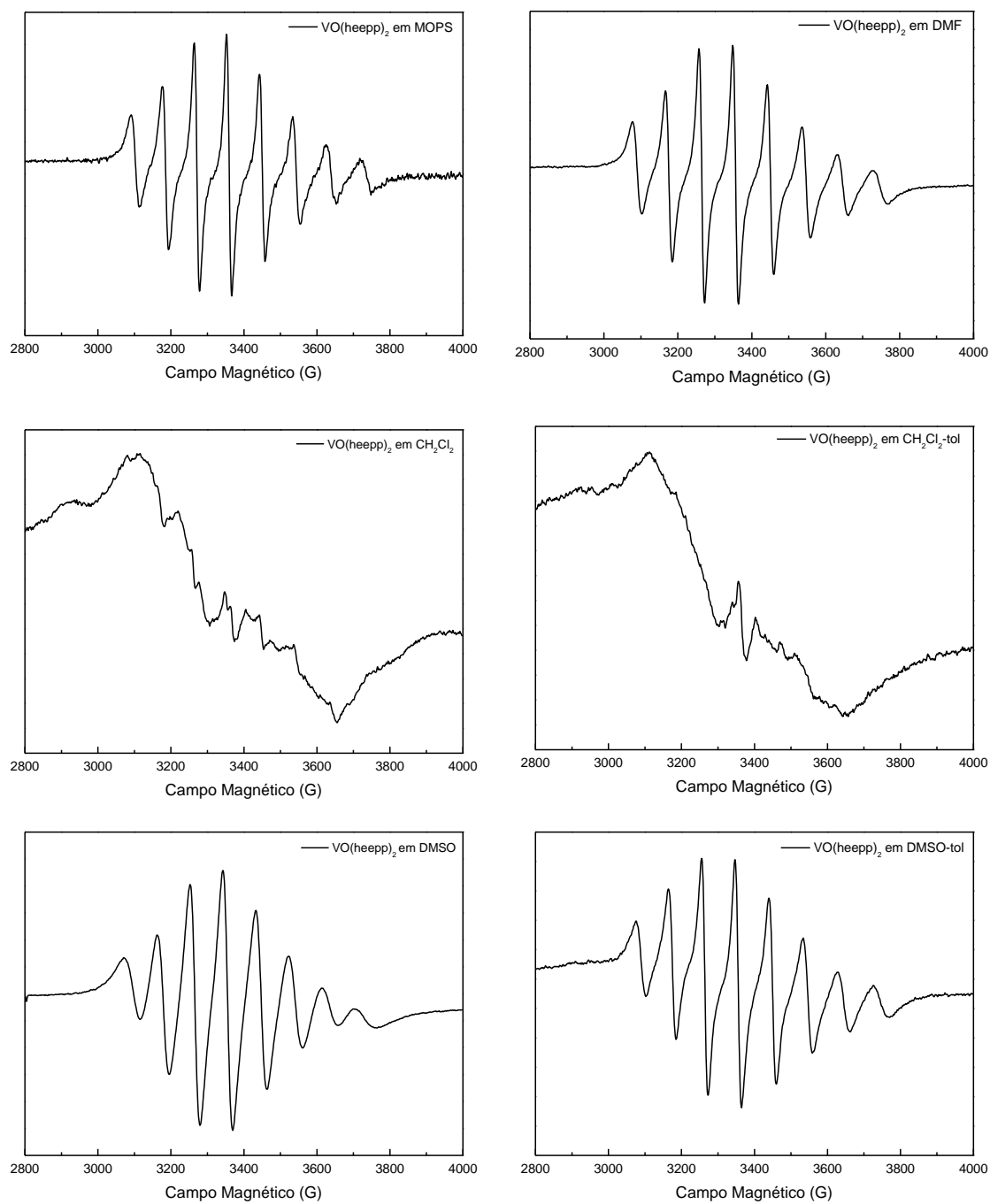


Figura 37 – Espectros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$.

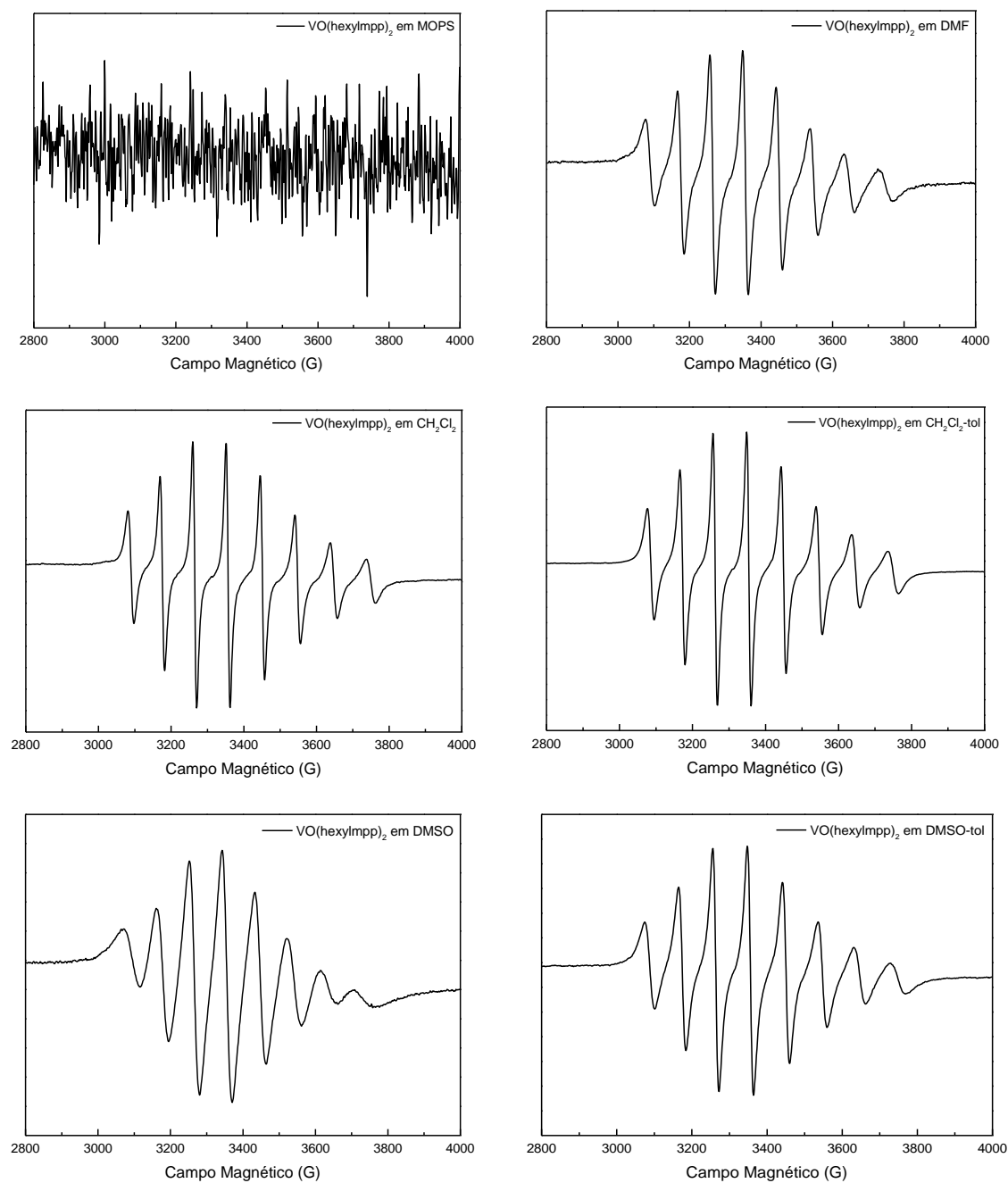


Figura 38 – Espectros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$.

Anexo 2

Espetros de RPE dos complexos de vanádio nos diferentes solventes e misturas (MOPS, DMSO, DMF, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -tol (1:1) e DMSO-tol(1:6)), a 100 K.

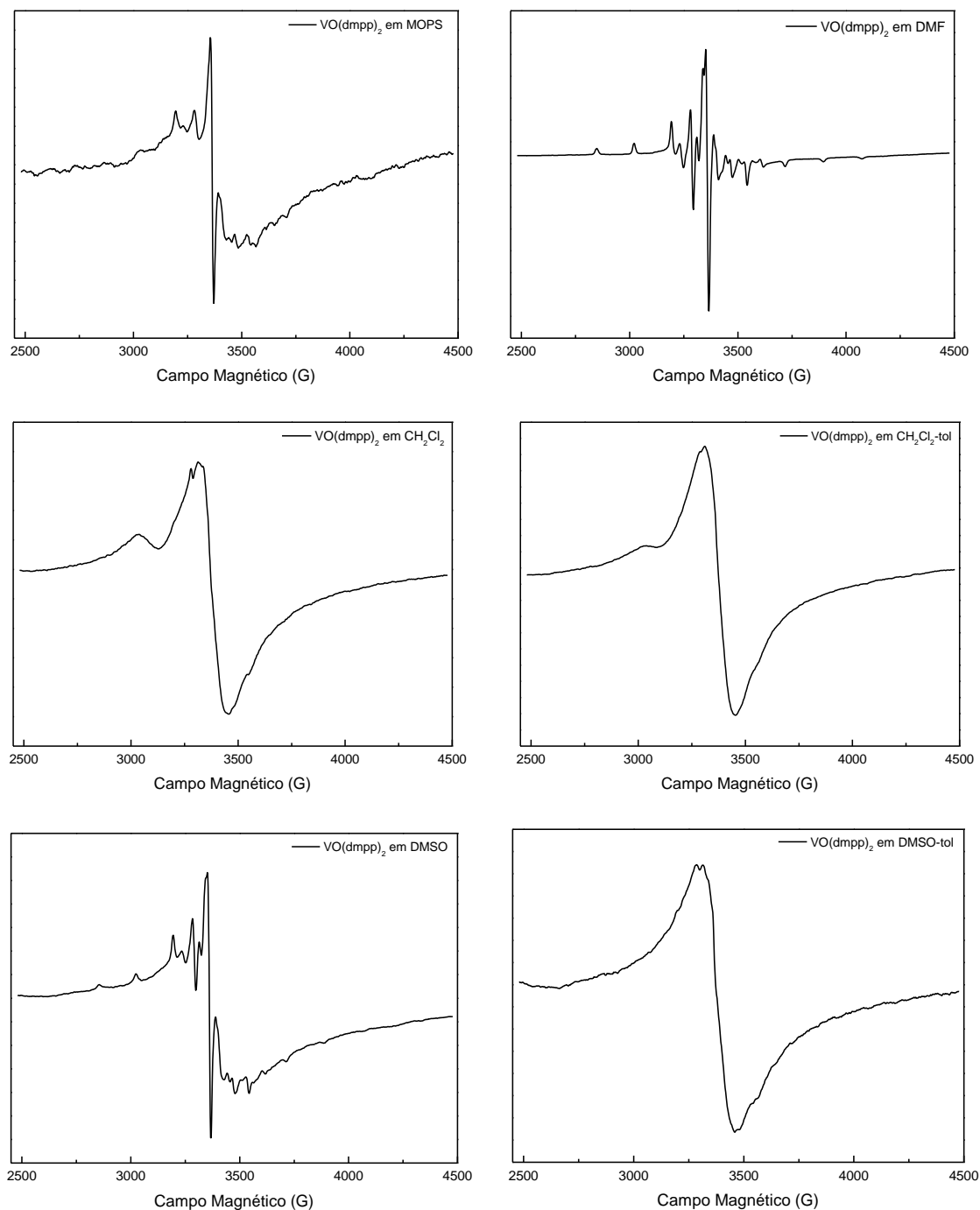


Figura 39 – Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$.

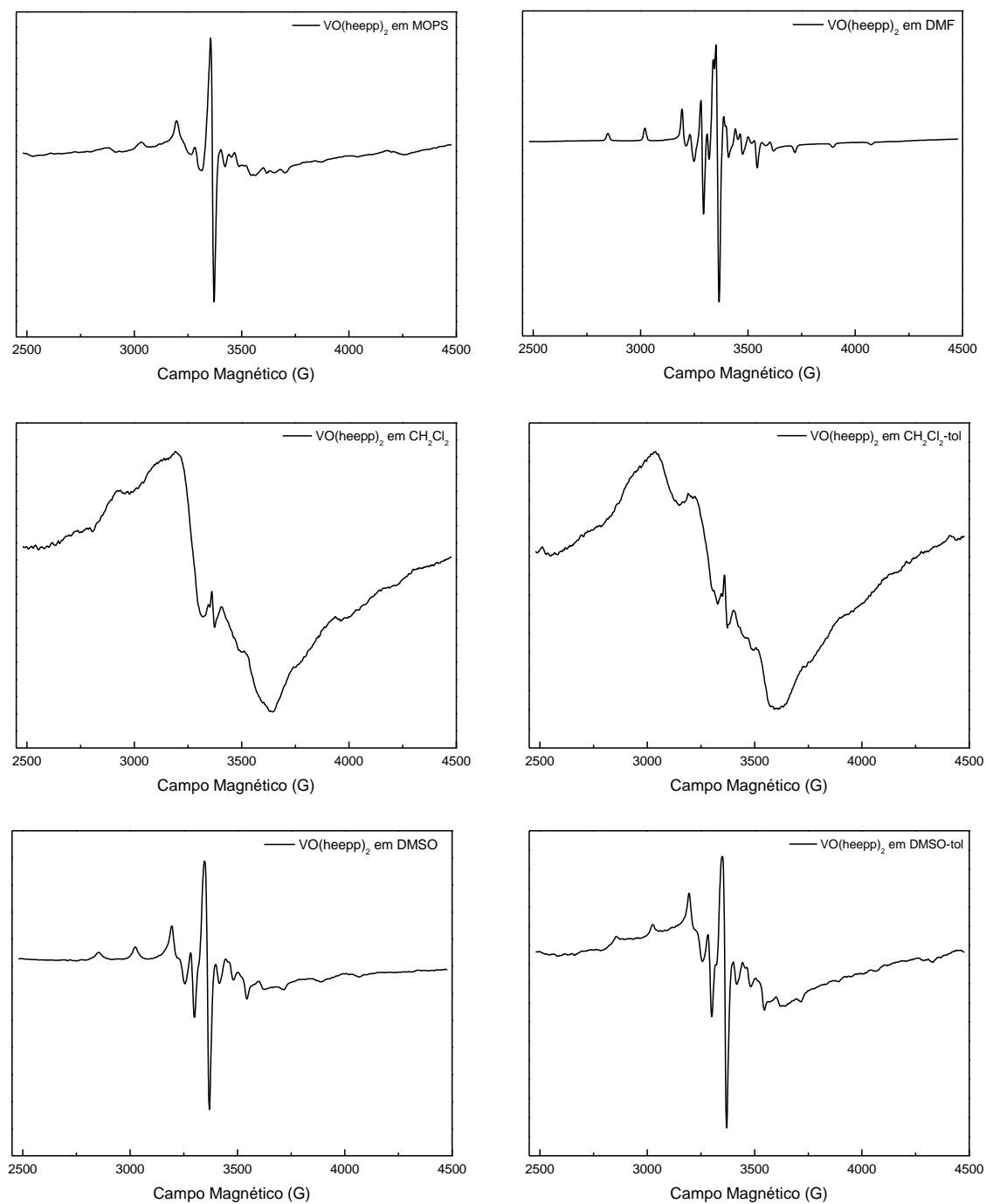


Figura 40 – Espectros de RPE do complexo VO(hepp)_2 .

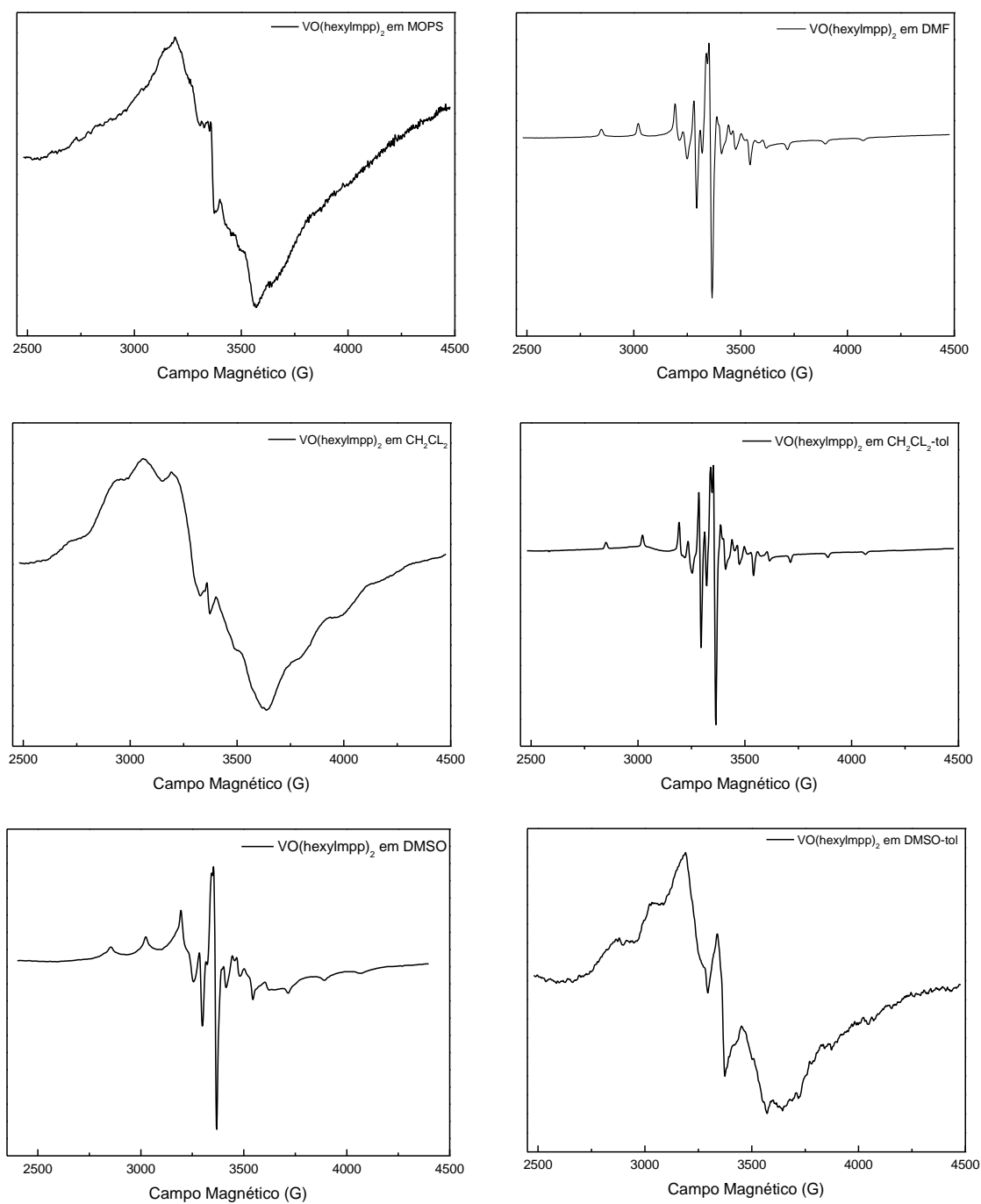


Figura 41 – Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylimpp})_2$.

Anexo 3

Espetros de RPE dos complexos de vanádio em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0 horas

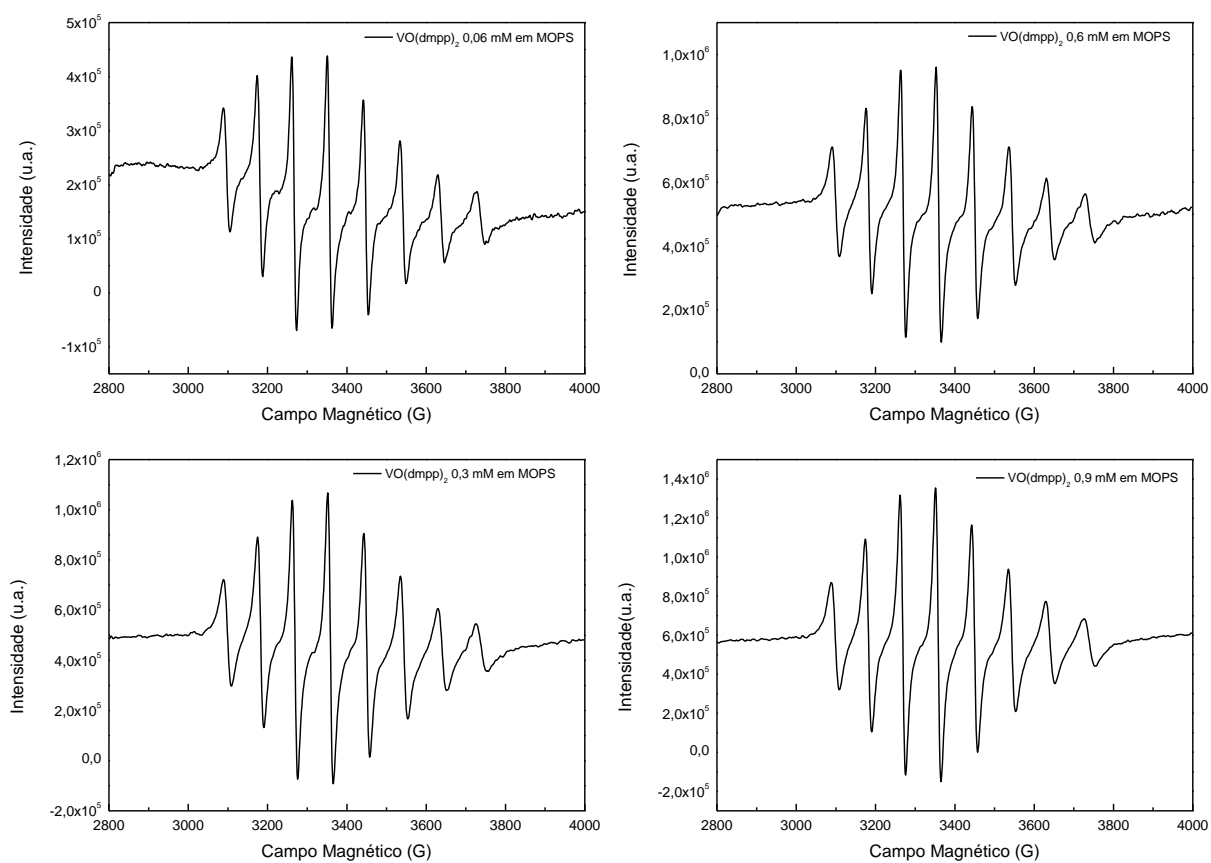


Figura 42 – Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$.

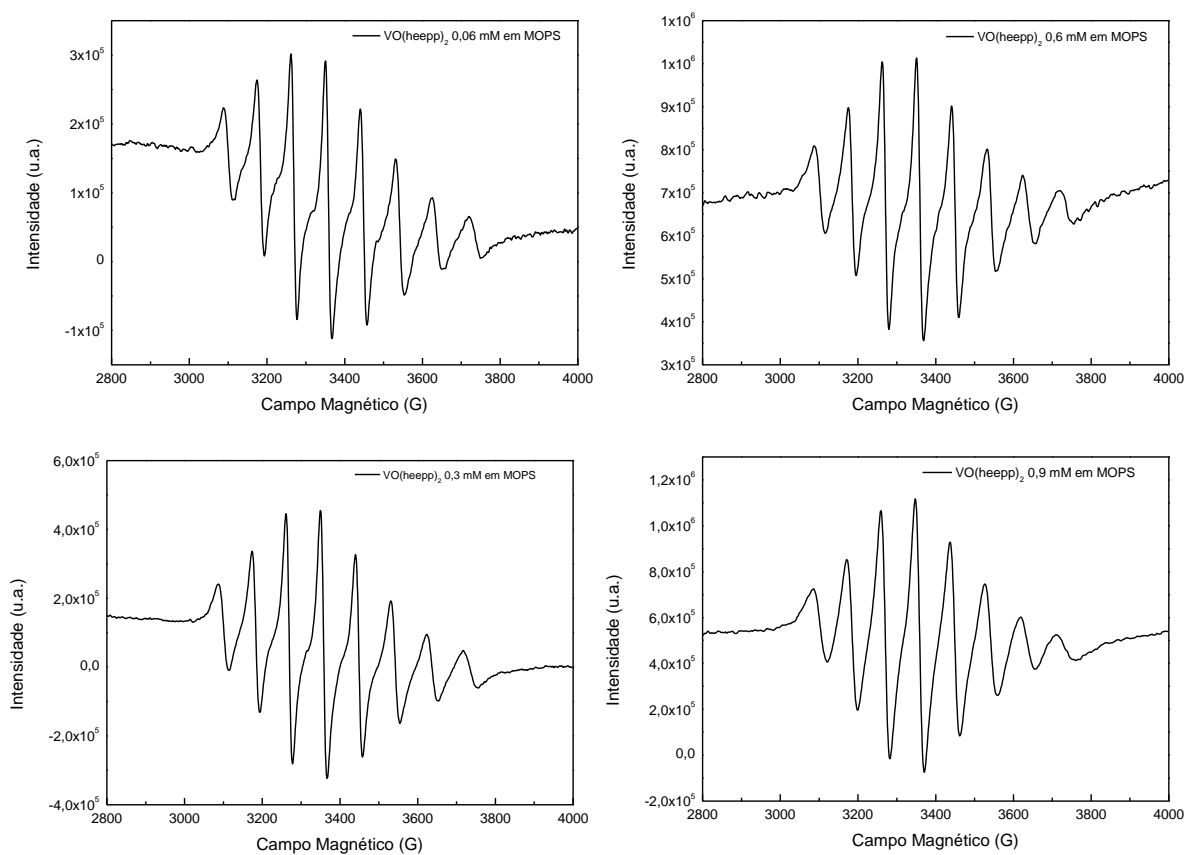


Figura 43 – Espectros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$.

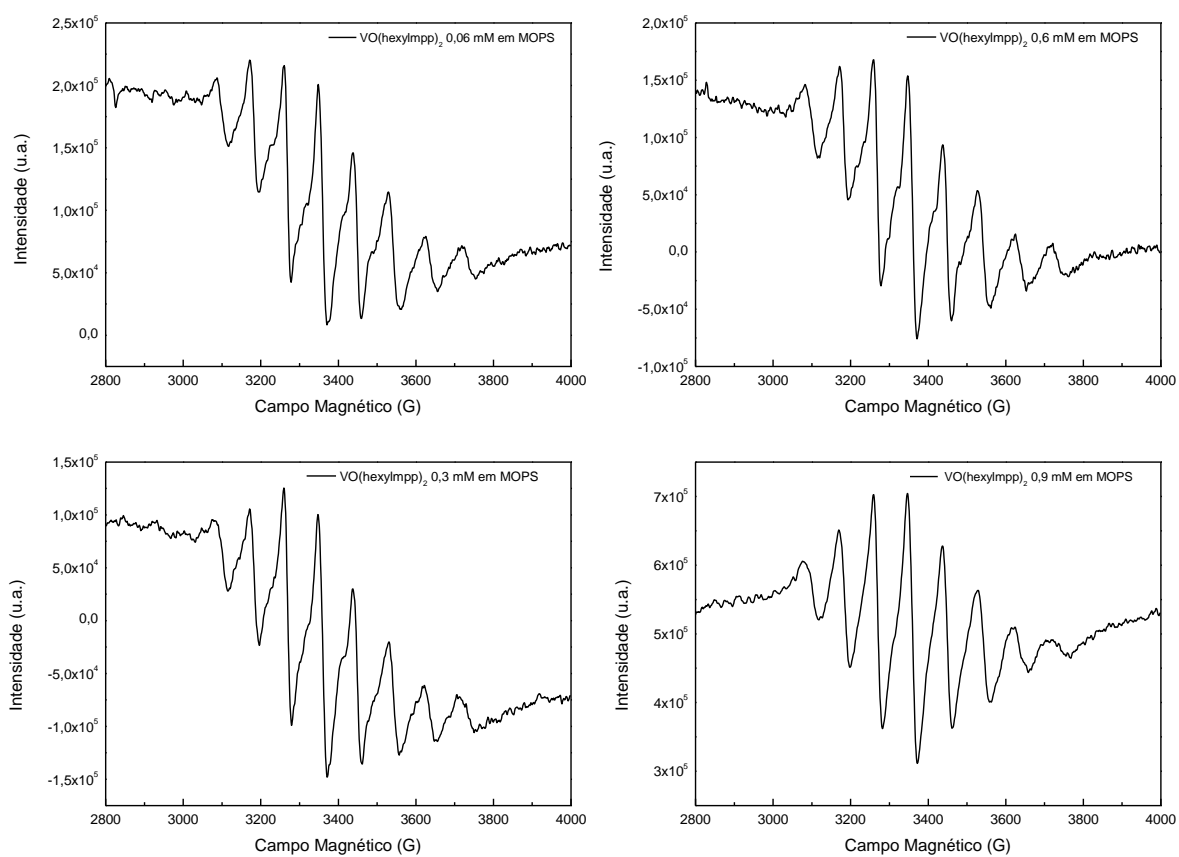


Figura 44 – Espectros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$.

Anexo 4

Espetros de RPE dos complexos de vanádio em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) a 100 K.

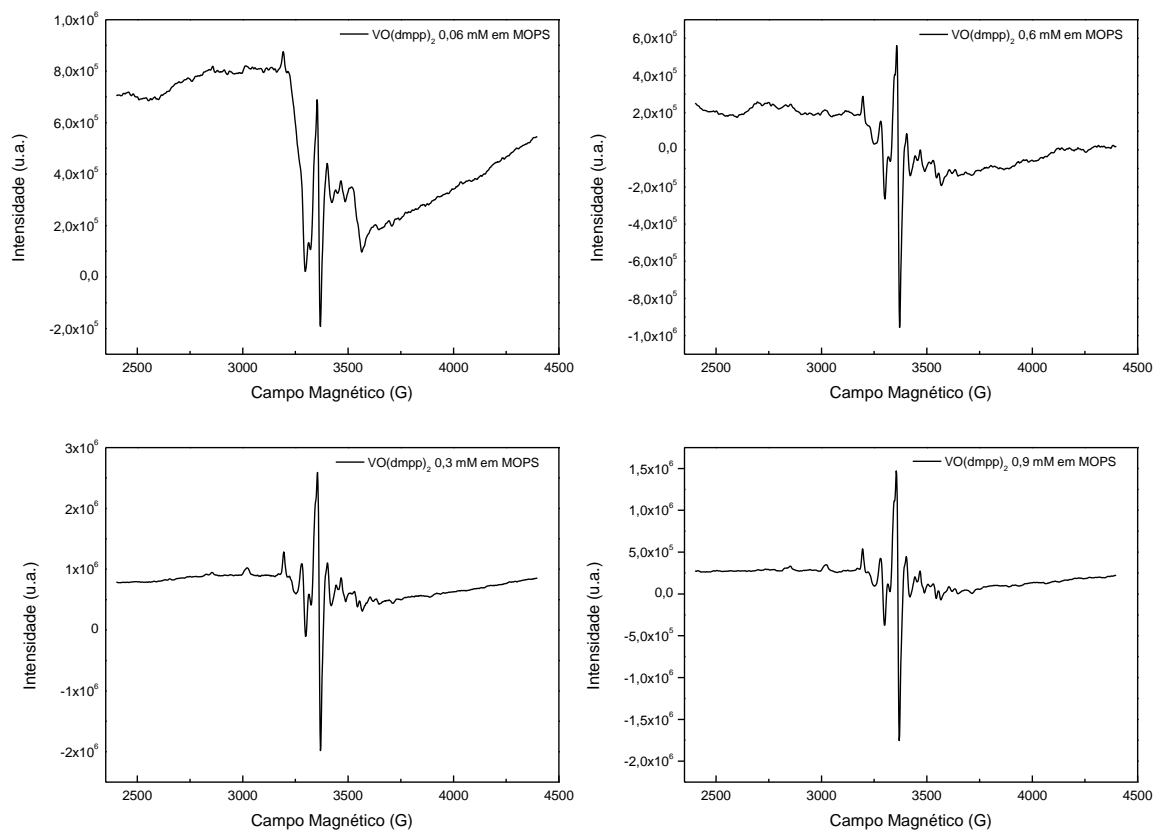


Figura 45 – Espetros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{dmpp})_2$.

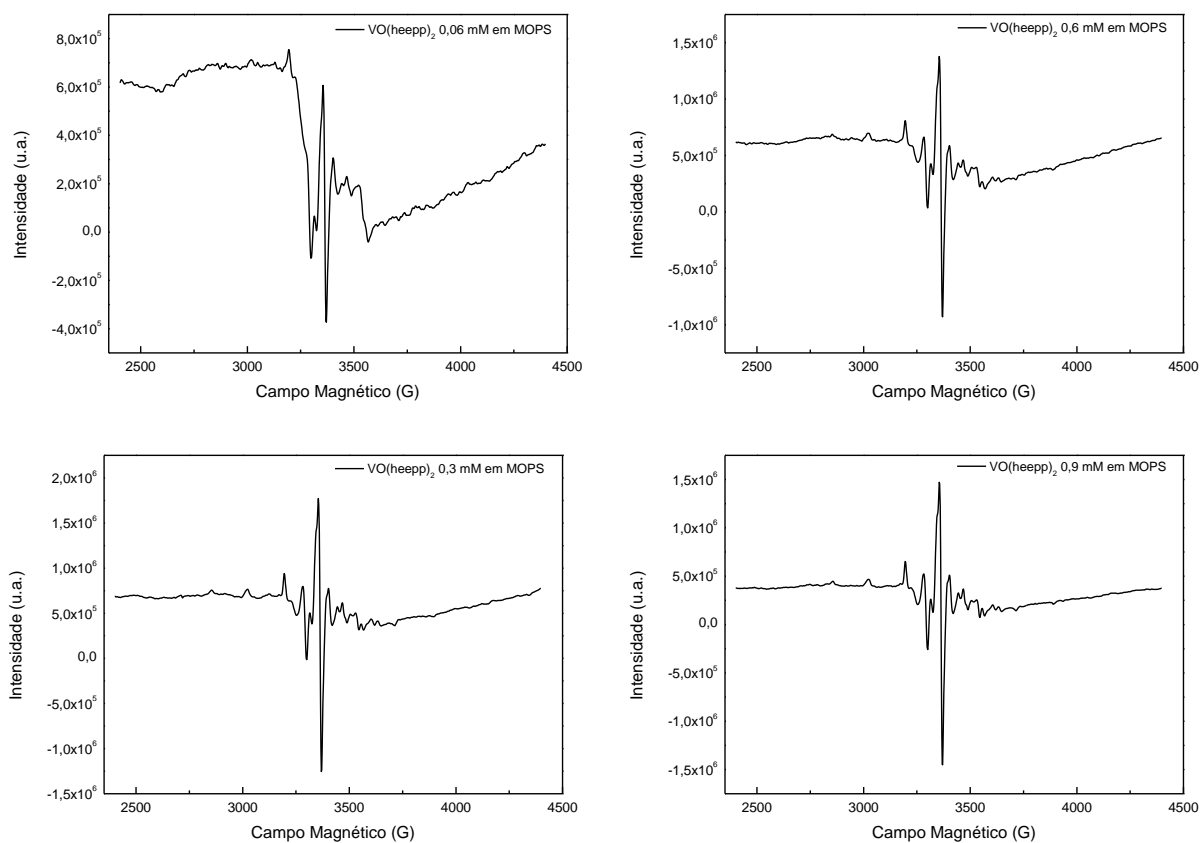


Figura 46 – Espectros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hepp})_2$.

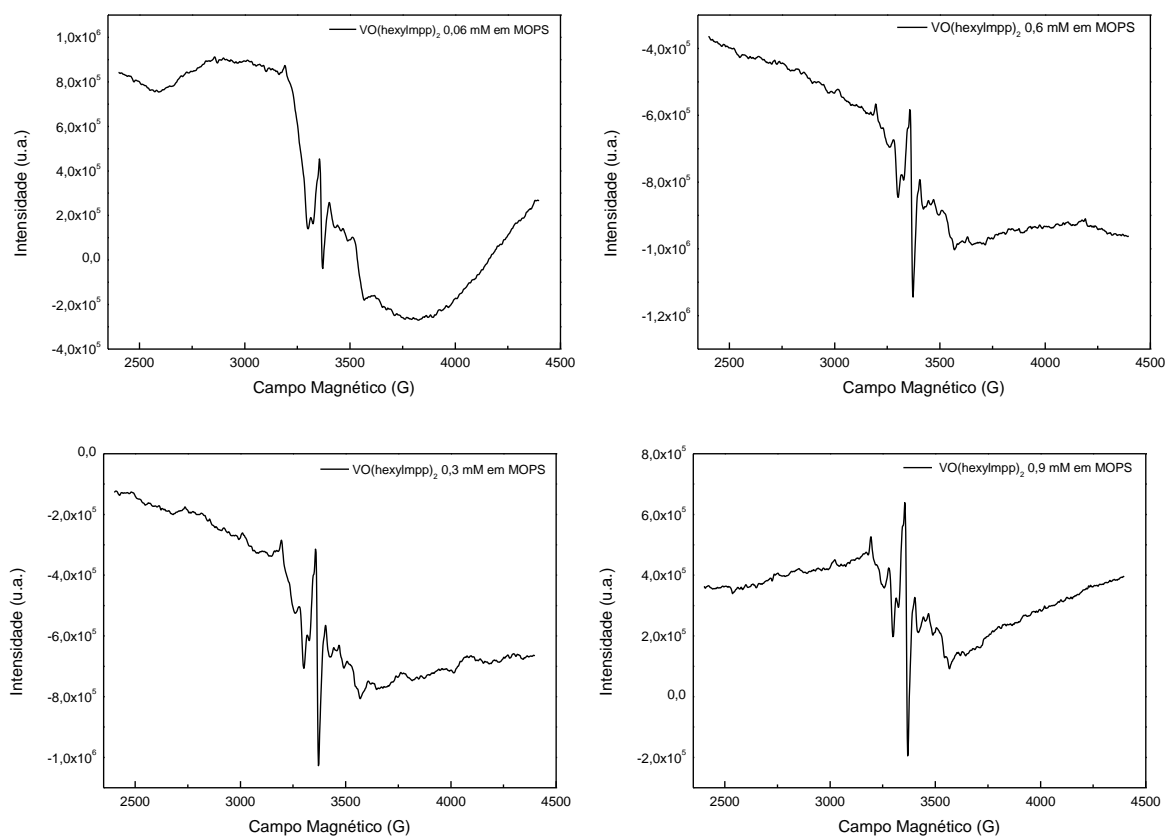


Figura 47 – Espectros de RPE do complexo $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$.

Anexo 5

Espetros de RMN de ^{51}V dos complexos de vanádio em MOPS (0,06mM; 0,6mM; 0,3mM e 0,9mM) à temperatura ambiente, às 0 horas.

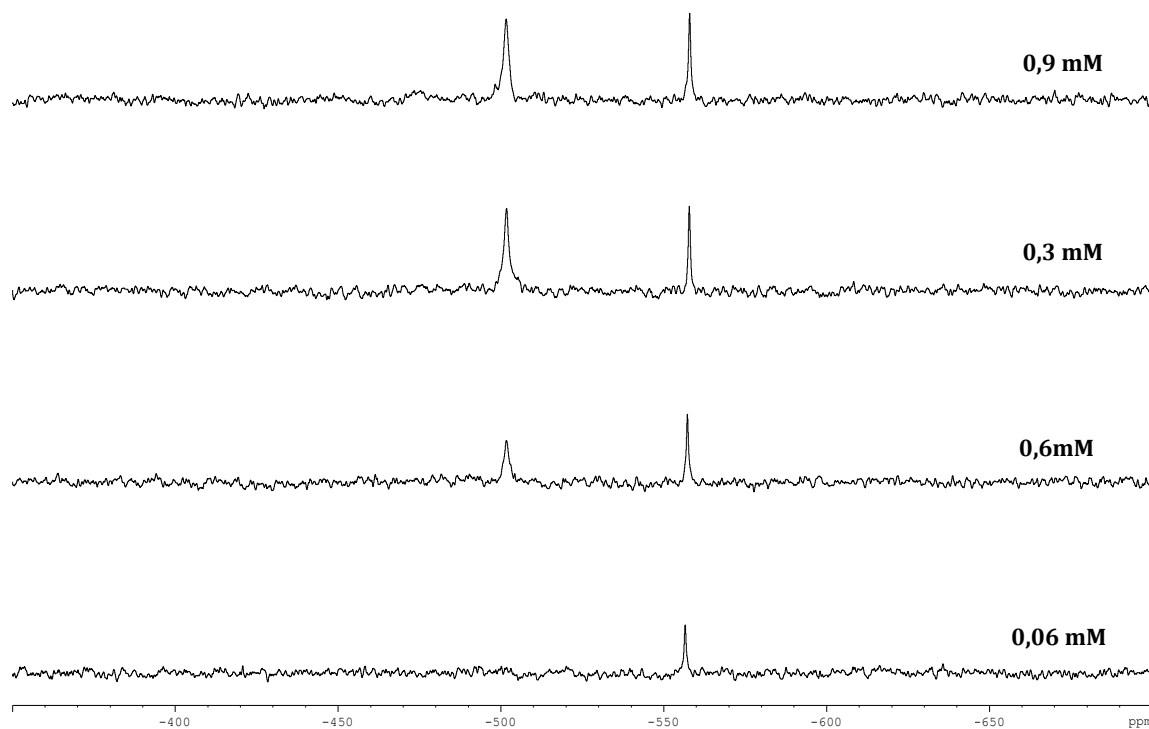


Figura 48 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{dmpp})_2$.

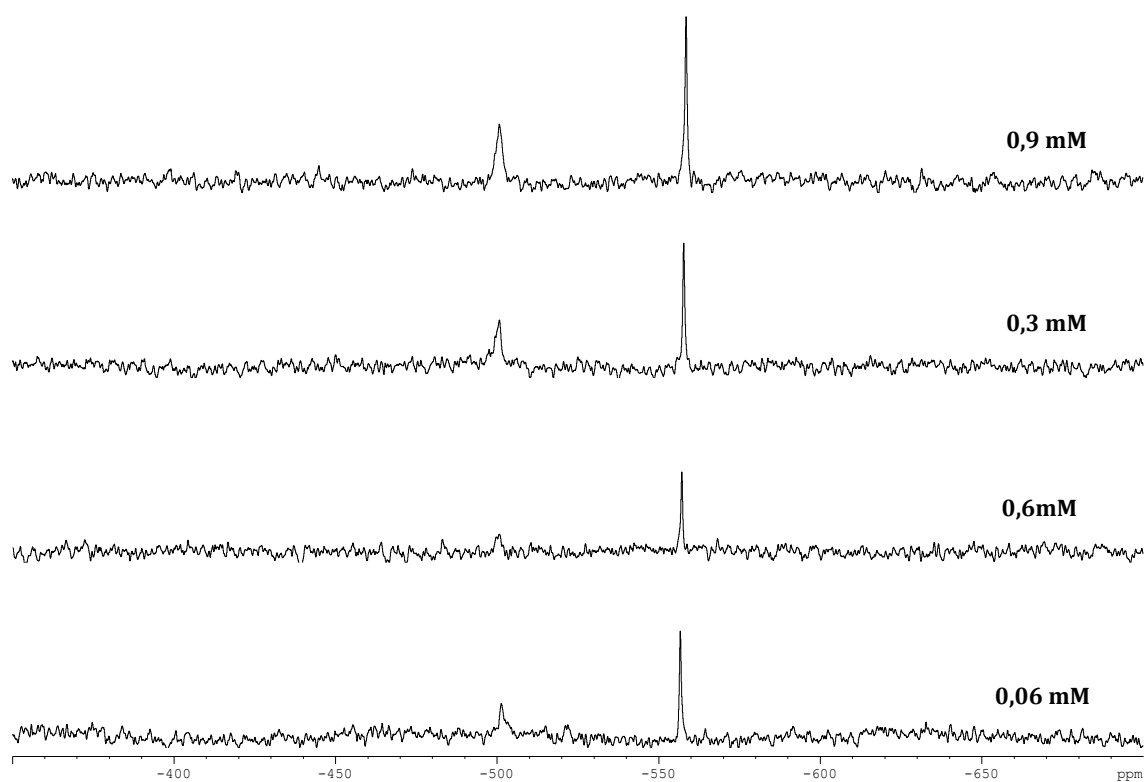


Figura 49 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hepp})_2$.

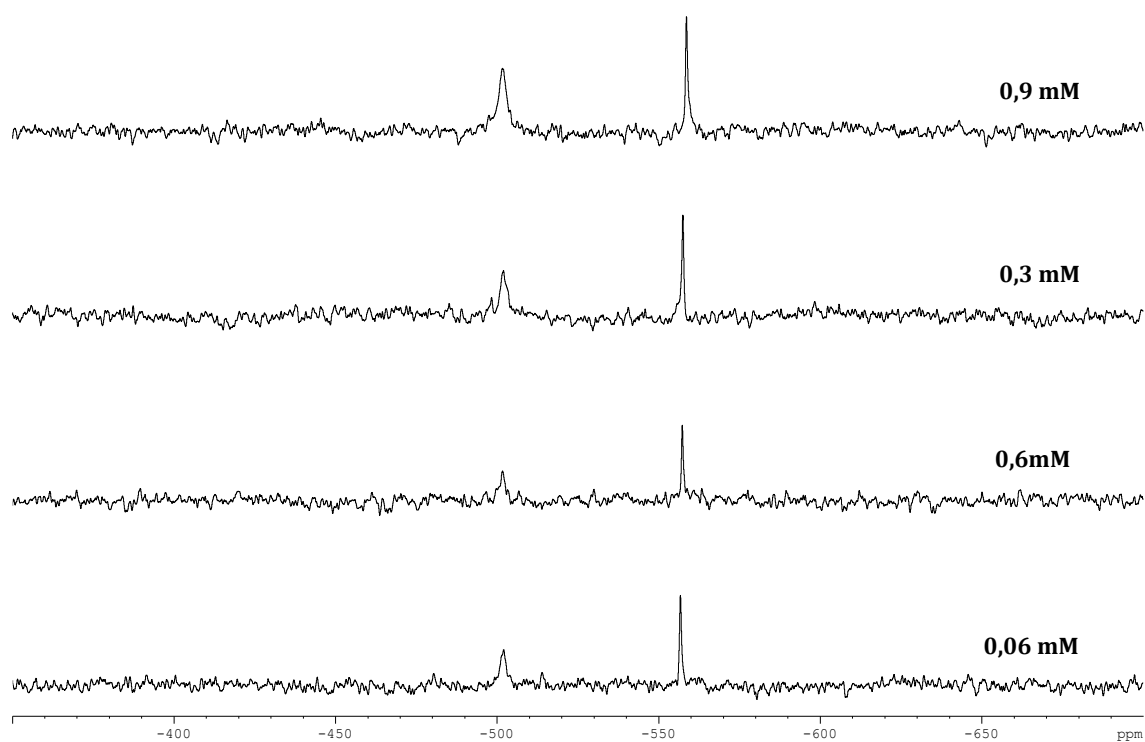


Figura 50 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$.

Anexo 6

Espetros de RMN de ^{51}V dos complexos de vanádio (0,06mM) em MOPS e em lipossomas de POPC à temperatura ambiente, às 0, 24 e 72 horas.

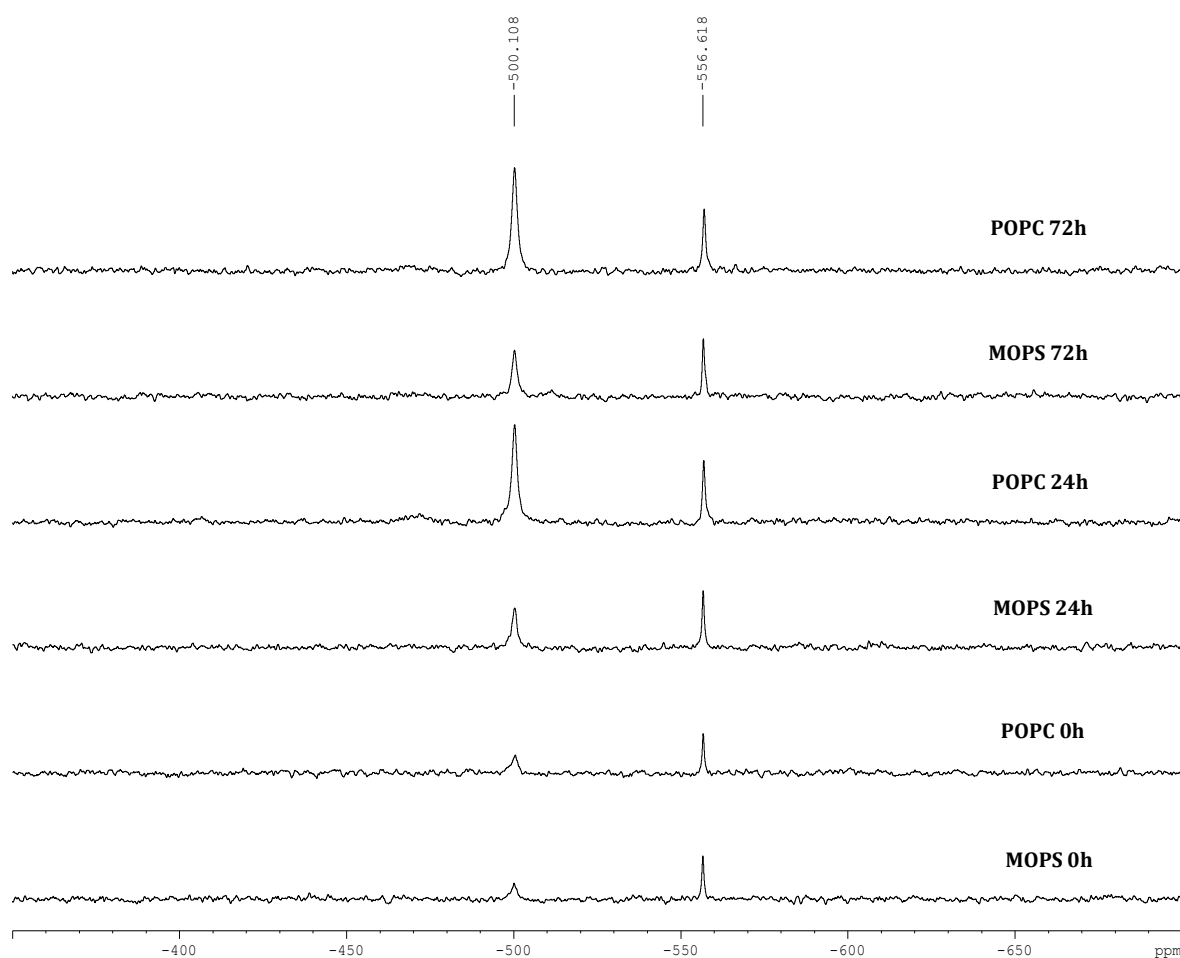


Figura 51 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{depp})_2$.

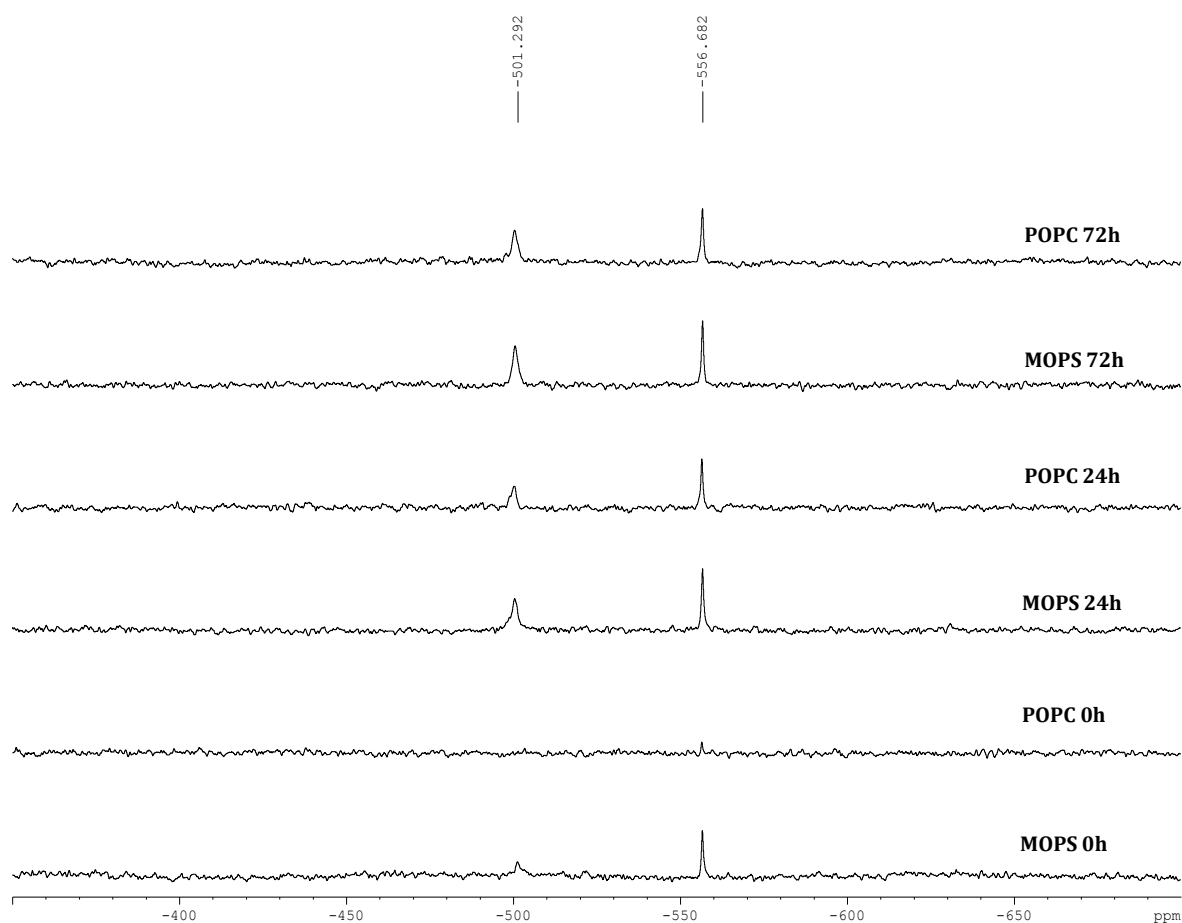


Figura 52 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hepp})_2$.

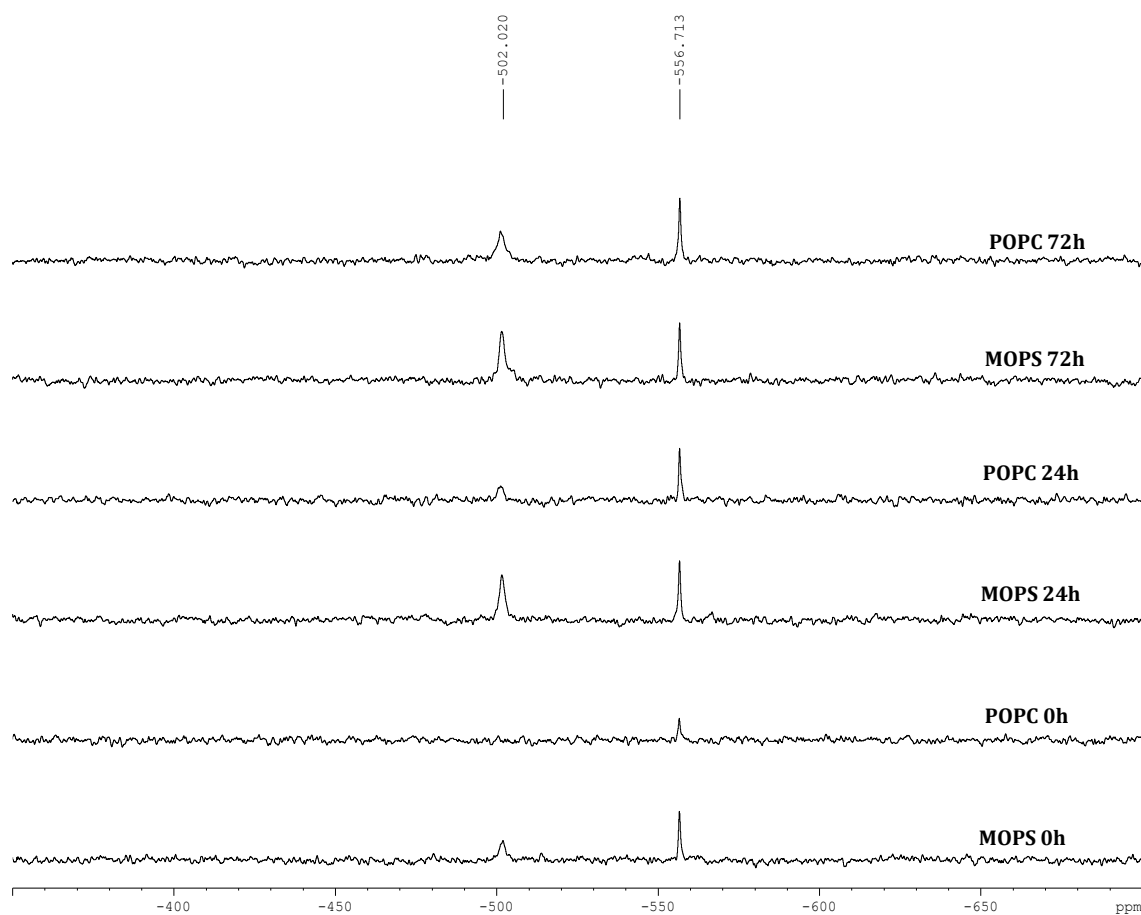


Figura 53 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$.

Anexo 7

Espetros de RMN de ^{51}V dos complexos de vanádio (0,9mM) em lipossomas de POPC às 0, 24 e 72 horas à temperatura ambiente.

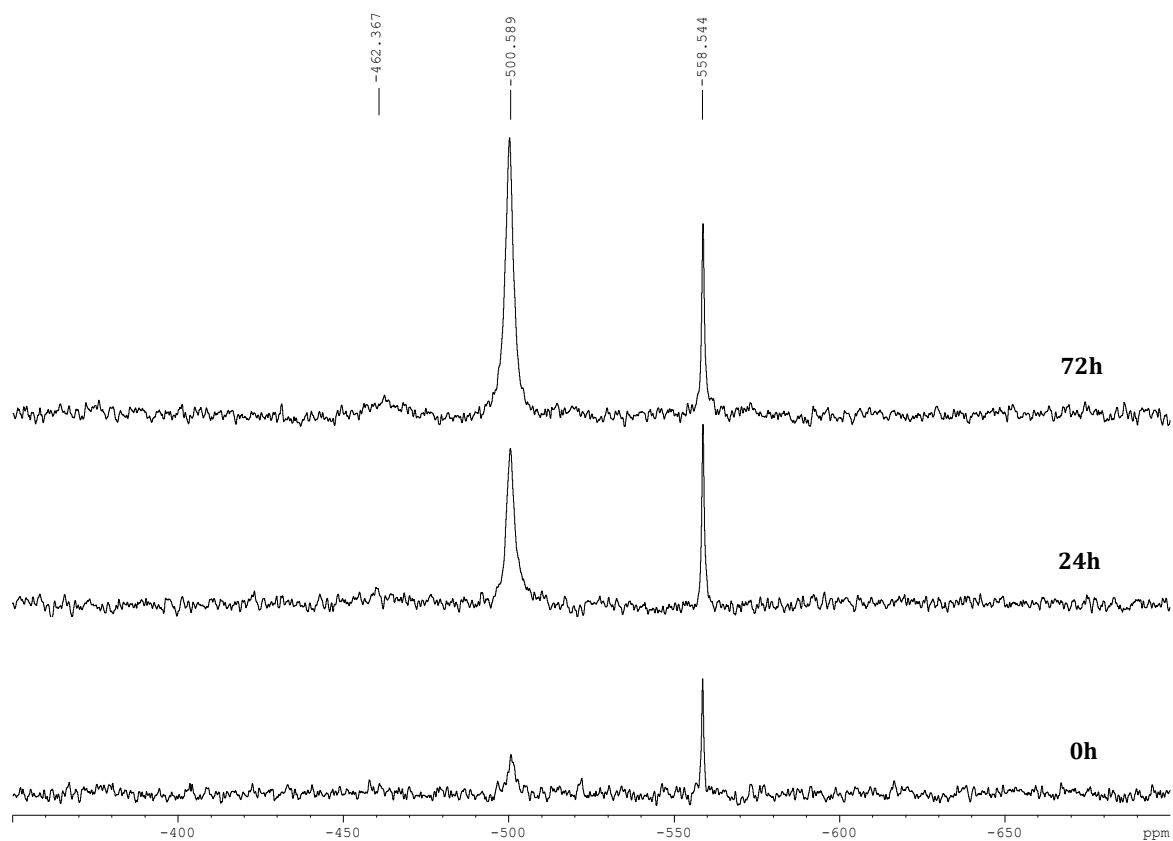


Figura 54 - Espetros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{depp})_2$.

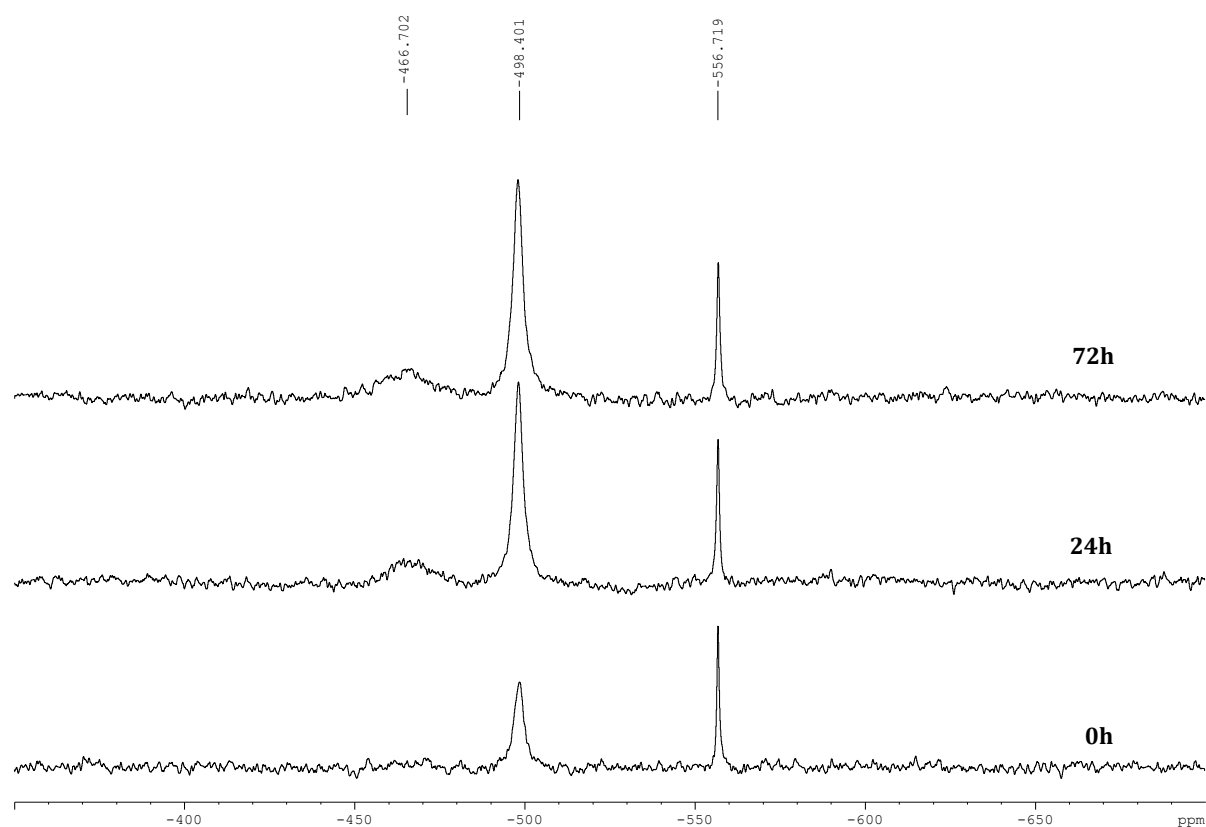


Figura 55 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hepp})_2$.

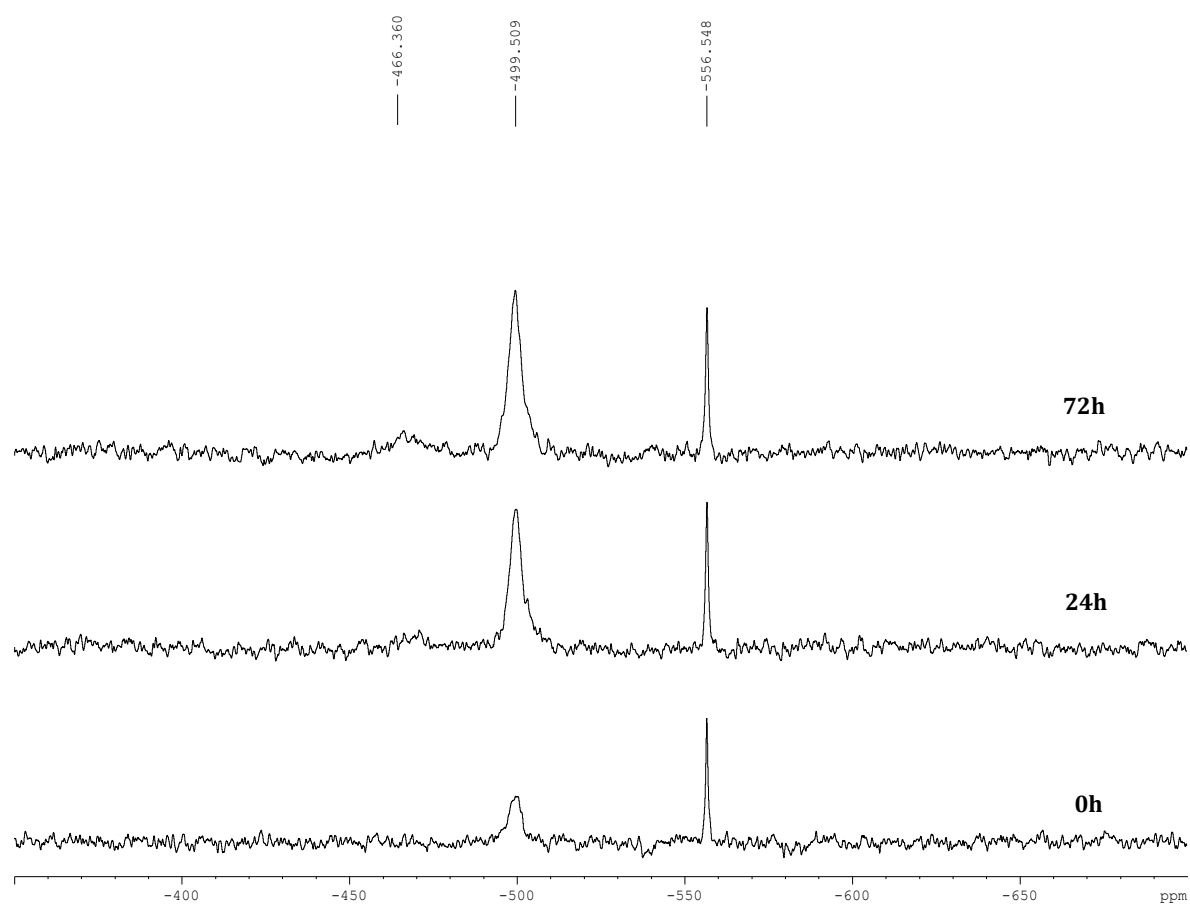


Figura 56 - Espectros de RMN de ^{51}V de $\text{VO}(\text{hexylmpp})_2$.